

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THIAGO RODRIGUES DA SILVA

O PAPEL DA PKC E DA PKMzeta NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO DE RATOS NA
RECONSOLIDAÇÃO E NA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA DE MEDO
CONTEXTUAL

CURITIBA

2020

THIAGO RODRIGUES DA SILVA

O PAPEL DA PKC E DA PKMzeta NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO DE RATOS NA
RECONSOLIDAÇÃO E NA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA DE MEDO
CONTEXTUAL

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Farmacologia, no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Aparecida Jark Stern

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Silva, Thiago Rodrigues da.

O papel da PKC e da PKMzeta no córtex pré-límbico de ratos na reconsideração e na persistência da memória de medo contextual. / Thiago Rodrigues da Silva. – Curitiba, 2020.

102 f. : il.

Orientadora: Cristina Aparecida Jark Stern.

Coorientador: Roberto Andreatini.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Proteínas quinases. 2. Memória. 3. Transtornos de estresse pós-traumáticos. 4. Medo. I. Título. II. Stern, Cristina Aparecida Jark. III. Andreatini, Roberto. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 612.82



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **THIAGO RODRIGUES DA SILVA** intitulada: **O PAPEL DA PKC E DA PKMzeta NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO DE RATOS NA RECONSOLIDAÇÃO E NA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA DE MEDO CONTEXTUAL**, sob orientação da Profa. Dra. CRISTINA APARECIDA JARK STERN, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Maio de 2020.

Assinatura Eletrônica

29/05/2020 12:37:42.0

CRISTINA APARECIDA JARK STERN
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

26/05/2020 09:30:36.0

LUCAS GAZARINI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO
SUL)

Assinatura Eletrônica

17/06/2020 12:39:33.0

MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

25/05/2020 17:58:55.0

BRUNO JACSON MARTYNHAK
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: pgfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2017

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 42107

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 42107

Dedico esta tese a minha querida Mãe, te amo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder a vida, por todo cuidado, graça e sabedoria.

A professora Dra. Cristina Aparecida Jark Stern, pela orientação e acompanhamento durante esta jornada, pelos ensinamentos, pela dedicação e pela colaboração com o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Roberto Andreatini, que inicialmente me deu a oportunidade de trilhar o caminho da pós-graduação, pelos ensinamentos e os momentos dispensados na co-orientação deste trabalho.

Ao professor Dr. Leandro José Bertoglio do programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC pela parceria no desenvolvimento deste trabalho.

À banca, professor Dr. Lucas Gazarini, professor Dr. Bruno Martynhak, professora Dra. Maria A. B. F. Vital, professora Dra. Janaina Zanoveli e Ronise Santiago pela contribuição e disponibilidade em avaliar este trabalho.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPR, Dra. Juliana Geremias Chichorro e Dr. Claudio da Cunha que avaliaram o meu exame de qualificação de doutorado.

Aos demais professores, funcionários e colaboradores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPR, que contribuíram para a minha formação científica.

Aos meus colegas do laboratório Ana Maria, Jeferson, Bruna e Daiane, pelo companheirismo no dia a dia. Aos alunos de iniciação científica que contribuíram com a rotina laboratorial durante este período.

Aos meus colegas do laboratório de Farmacologia do Sistema Nervoso Central, Camila, Maryana, Daniele, Leonardo e José pela convivência e companheirismo.

Aos demais colegas do Programa de Pós-graduação.

Aos meus irmãos Érica e Gabriel, pela convivência, paciência e companheirismo em todos os momentos.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante estes anos.

À *International Society for Neurochemistry*, à *International Brain Research Organization*, e à *Society for Neuroscience*, pelo apoio financeiro recebido para a 4ª ISN Latin American School - 2017, e 49º Neuroscience SFN-2019.

A todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

Sou eternamente grato.

*“Em muitas áreas da vida, vencer significa não precisar competir
com ninguém para ser feliz.”*

Thiago Grulha

RESUMO

A formação e manutenção da memória aversiva tem grande impacto na qualidade de vida dos indivíduos. Muita atenção é dada aos mecanismos subjacentes à reconsolidação da memória, uma vez que podem servir como alvo para o tratamento de transtornos psiquiátricos como o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT). Porém, os mecanismos envolvidos na persistência da memória após a evocação e reconsolidação são pouco conhecidos. Sugere-se que a proteína quinase C (PKC) participa da persistência da memória reativada e que o córtex cingulado anterior dorsal (CCAd) em humanos com TEPT está hiperativado, e isso estaria relacionado aos sintomas da doença. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar o papel da PKC e da PKM ζ (isoforma atípica da PKC) no córtex PL, na reconsolidação e na persistência da memória de medo contextual de ratos. O protocolo de condicionamento foi composto principalmente dos dias 1- familiarização; dia 2- condicionamento; dia 3- reativação; dia 4- Teste A₁; dia 7- Teste A₂ e dia 21- Teste A₃. Os animais foram submetidos a esse protocolo e receberam a administração de tamoxifeno (antagonista de receptor de estrógeno e inibidor de PKC), queleritrina (inibidor seletivo de PKC) ou ZIP (inibidor da PKM ζ) em diferentes tempos após a reativação. O tamoxifeno infundido no córtex PL imediatamente após a reativação da memória de medo reduziu a porcentagem de tempo de congelamento no Teste A₁ e Teste A₂. Essa mesma droga reduziu o congelamento dos animais no Teste A₂, mas não no Teste A₁, quando administrado no córtex PL 6 h após a reativação. Esses dados sugerem a participação do córtex PL e da PKC na reconsolidação e persistência da memória reativada. Então, a expressão da proteína de citoesqueleto Arc foi avaliada por western blot em diferentes momentos após a reativação no córtex PL. Houve um aumento significativo da expressão da Arc imediatamente, 90 min, e 6 horas após a reativação. Em seguida, a queleritrina foi administrada no córtex PL imediatamente, 6, 9, 12 ou 18 h após a evocação. Imediatamente após, a queleritrina reduziu o congelamento dos animais quando expostos ao Teste A₁. Esse efeito foi duradouro e dependeu da reativação da memória, sugerindo um prejuízo de reconsolidação. Quando administrada 6, 9 ou 12 h após a reativação, a queleritrina reduziu o tempo de congelamento quando os animais foram expostos ao Teste A₂ após 7 dias, mas não, no Teste A₁, sugerindo um efeito sobre a persistência da memória. Esse efeito dependeu da reativação da memória. Para investigar o papel da PKM ζ , os animais receberam o ZIP no córtex PL imediatamente, 1 ou 6 h após a reativação da memória. Em nenhum dos momentos escolhidos o ZIP reduziu a porcentagem de congelamento no Teste A₁, sugerindo que a PKM ζ no córtex PL não participa da reconsolidação da memória. No entanto, 1 e 6 h após, o ZIP reduziu o congelamento dos animais quando testados após 7 dias no Teste A₂, sugerindo que a PKM ζ participa da persistência da memória reativada. Ainda, o efeito do ZIP administrado no córtex PL 6 h após a reativação durou até 21 dias, depende da reativação da memória e não depende da exposição prévia ao Teste A₁. Os resultados sugerem a participação de PKC's típicas, mas não atípica, na reconsolidação da memória de medo ao contexto no córtex PL e sugere que a isoforma atípica, PKM ζ , é necessária para a persistência da

memória reativada. Por fim, o presente trabalho propõe que a evocação da memória gera mecanismos independentes que levam à reconsolidação e persistência da memória, ampliando assim, a janela temporal para interferências nessa memória.

Palavras-chave: PKC; PKM ζ ; Reconsolidação da memória; Persistência da memória; TEPT.

ABSTRACT

The formation and maintenance of aversive memories have a great impact on individuals' life quality. The mechanisms underlying memory reconsolidation since have received much attention, since they can serve as target for the treatment of psychiatric disorders such as post-traumatic stress disorder (PTSD). However, the mechanisms involved in memory persistence after retrieval and reconsolidation are poorly understood. It is suggested that protein kinase C (PKC) participates in the reactivated memory persistence and that the dorsal anterior cingulate cortex (dACC) in human dACC is overactivated in PTSD, and this would be related to the symptoms of disease. Thus, this study aimed to investigate the role of PKC and PKM ζ (atypical PKC isoform) in the PL cortex, in contextual fear memory reconsolidation and persistence. The conditioning protocol was composed mainly of days 1 - familiarization; day 2 - conditioning; day 3 - reactivation; day 4 - Test A₁; day 7 - Test A₂ and day 21 - Test A₃. The animals were submitted to this protocol and received the administration of tamoxifen (estrogen receptor antagonist and PKC inhibitor), chelerythrine (selective PKC inhibitor) or ZIP (PKM ζ inhibitor) at different moments after reactivation. TMX infused into the PL cortex immediately after reactivation of fear memory reduced the percentage of freezing time in Test A₁ and Test A₂. When administered in the PL cortex 6 h after reactivation, this drug reduced the freezing in Test A₂, but not in Test A₁. These data suggest the participation of the PL cortex and PKC in fear memory reconsolidation and persistence. Then, the expression of the cytoskeleton protein Arc in the PL cortex was evaluated by Western blot at different times after reactivation. There was a significant increase in Arc expression immediately, 90 min, and 6 hours after reactivation. Thereafter, chelerythrine was administered in the PL cortex immediately, 6, 9, 12 or 18 h after reactivation. Immediately afterward, chelerythrine reduced the freezing time of animals that were exposed to Test A₁. This effect was long-lasting and depended on memory reactivation, suggesting a reconsolidation disruption. When administered 6, 9 or 12 h after reactivation, chelerythrine reduced the freezing time when animals were exposed to Test A₂ after 7 days, but not in Test A₁, suggesting an effect on memory persistence. This effect depended on memory reactivation. To investigate the role of PKM ζ , the animals received ZIP in the PL cortex immediately, 1 or 6 h after memory reactivation. ZIP didn't reduce the freezing percentage in Test A₁ in none of the chosen moments, suggesting that PKM ζ in the PL cortex is not required for memory reconsolidation. However, 1 and 6 h after, ZIP reduced freezing when animals were tested 7 days later in Test A₂, suggesting that PKM ζ participates in the reactivated memory persistence. In addition, the effect of ZIP administered in the PL cortex 6 h after reactivation lasted up to 21 days, depended on memory reactivation and did not depend on previous exposure to Test A₁. The results suggest the participation of typical, but not atypical, PKC's in the reconsolidation of contextual fear memory in the PL cortex and suggest that the atypical isoform, PKM ζ , is necessary for reactivated memory persistence. Finally, the present work proposes that memory retrieval generates independent mechanisms that lead to memory reconsolidation and persistence, thus expanding the time window for interferences in memory.

Keywords: PKC; PKM ζ ; Memory reconsolidation; Memory persistence; PTSD.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Representação esquemática dos processos de formação e persistência da memória.....	24
FIGURA 2 -	Representação esquemática dos processos de reconsolidação e persistência da memória.....	27
FIGURA 3 -	Figura esquemática da estrutura das isoformas da proteína quinase C (PKC).....	29
FIGURA 4 -	Representação esquemática da expressão das PKC's atípicas durante a LTP.....	31
FIGURA 5 -	O mecanismo de manutenção da memória subjacente a LTP mediado pela PKM ζ	33
FIGURA 6 -	Representação esquemática do cortex pré-frontal medial...	36
FIGURA 7 -	Desenho esquemático do córtex pré-frontal medial de rato.	42
FIGURA 8 -	Figura esquemática das sessões experimentais.....	44
FIGURA 9 -	Figura esquemática do delineamento experimental 1.....	45
FIGURA 10 -	Figura esquemática do delineamento experimental 2.....	46
FIGURA 11 -	Figura esquemática do delineamento experimental 3.....	46
FIGURA 12 -	Figura esquemática do delineamento experimental 4.....	47
FIGURA 13 -	Figura esquemática do delineamento experimental 5.....	47
FIGURA 14 -	Figura esquemática do delineamento experimental 6.....	48
FIGURA 15 -	Figura esquemática do delineamento experimental 7.....	49
FIGURA 16 -	Figura esquemática do delineamento experimental 8.....	49
FIGURA 17 -	Efeitos da inibição da PKC no córtex PL e CCA pelo tamoxifeno na reconsolidação e na persistência da memória imediatamente ou 6 horas após a reativação.....	54

FIGURA 18 -	A expressão da proteína Arc no córtex PL após a reativação da memória de medo.....	56
FIGURA 19 -	Efeitos da inibição da PKC no córtex PL pela queleritrina na persistência da memória em diferentes pontos de tempo após a reativação da memória.....	59
FIGURA 20 -	O prejuízo da persistência da memória induzido pela inibição da PKC no córtex PL requer reativação prévia da memória.....	61
FIGURA 21 -	Efeitos da inibição da PKM ζ no córtex PL por ZIP na persistência de uma memória de medo contextual reativada....	62
FIGURA 22 -	O prejuízo da persistência da memória induzido pela inibição da PKM ζ no córtex PL requer reativação prévia da memória.....	64
FIGURA 23 -	O prejuízo da persistência da memória induzido pela inibição da PKM ζ no córtex PL é independente do tempo decorrido entre a administração de ZIP e o teste A ₁	65
FIGURA 24 -	Efeitos da inibição da PKC do córtex PL pela queleritrina na reconsolidação de uma memória de medo contextual reativada.....	67
FIGURA 25 -	O prejuízo da reconsolidação da memória induzido pela inibição da PKC no córtex PL requer reativação prévia da memória.....	68
FIGURA 26 -	Efeitos da inibição da PKM ζ do córtex PL imediatamente ou 1 hora após a reativação por ZIP na reconsolidação de uma memória de medo contextual.....	70
FIGURA 27 -	Interferências farmacológicas em uma janela estendida após a reativação da memória de medo, podem promover o prejuízo sobre a reconsolidação ou sobre a persistência da memória aversiva	86

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AMPA	- Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	- Análise de variância (do inglês: <i>analysis of variance</i>)
AP	- Anteroposterior
Arc	- Proteína associada ao citoesqueleto regulada por atividade (do inglês: <i>Activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i>)
ATP	- Adenosina trifosfato
BDNF	- Fator neurotrófico derivado de cérebro (do inglês, <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>)
BLA	- Amígdala Basolateral (do inglês: <i>basolateral amigdala</i>)
Ca ²⁺	- Cálcio
CaMKII	- Proteína quinase II dependente de cálcio
CCA	- Córtex cingulado anterior
CI	- Córtex insular
CPFm	- Córtex pré-frontal medial
CREB	- Proteína de ligação do elemento responsivo ao AMPc (do inglês: <i>cyclic amp-response element binding protein</i>)
DAG	- Diacilglicerol
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DSM-V	- Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5. ^a edição (do inglês: <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5</i>)
DV	- Dorsoventral
EC	- Estímulo condicionado
EI	- Estímulo incondicionado
eIF4E	- Fator de iniciação da tradução
EPM	- Erro padrão da média
ERK	- Quinase regulada por sinal extracelular (do inglês: <i>Extracellular signal regulated kinases</i>)
EUA	- Estados Unidos da América
GAP-43	- Proteína 43 associada ao crescimento (do inglês: <i>growth asso-</i>

ciated protein 43)

i.p.	- Intraperitoneal
IL	- Infralímbico
IP ₃	- Inusitol trifostato
LTP	- Potenciação de longa duração (do inglês: <i>Long-term potentiation</i>)
MAPK	- Proteínas quinases ativadas por mitógenos (do inglês: <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
Mg ²⁺	- Magnésio
mGluRs	- Receptores glutamatérgicos metabotrópicos (do inglês: <i>metabotropic glutamate receptors</i>)
ML	- Mediolateral
mTOR	- Proteína quinase ativada por mitogênio
NMDA	- N-metil-d-Aspartato
PBS	- Salina tamponada
PIP ₂	- Fosfatidil-inositol bifosfato
PKA	- Proteína Quinase A (do inglês: <i>Protein Kinase A</i>)
PKC	- Proteína quinase C (do inglês: <i>Protein Kinase C</i>)
PKMζ	- Proteína quinase Mζ (do inglês: <i>Protein kinase Mζ</i>)
PL	- Pré-límbico
PRKCζ	- Gene da proteína quinase C zeta
PSD	- Densidade pós-sináptica (do inglês: <i>postsynaptic density</i>)
QUE	- Queleritrina
RNA _m	- Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês: <i>Messenger ribonucleic acid</i>)
SCR-ZIP	- Scrambled-ZIP
SNC	- Sistema nervoso central
TEPT	- Transtorno de estresse pós-traumático
TMX	- Tamoxifeno
VEI	- Veículo
ZIP	- Peptídeo zeta inibitório

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	As memórias.....	19
1.2	O transtorno do estresse pós-traumático.....	19
1.3	A consolidação das memórias.....	20
1.4	A persistência das memórias.....	23
1.5	A reconsolidação das memórias.....	24
1.6	A proteína quinase C.....	27
1.7	A PKM ζ	31
1.8	O córtex pré-frontal medial.....	34
2	HIPÓTESE.....	37
3	OBJETIVO.....	38
3.1	Objetivos específicos.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1	Animais.....	40
4.2	Drogas.....	40
4.3	Cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas.....	41
4.4	Infusão bilateral das drogas.....	41
4.5	Aparato.....	43
4.6	Procedimentos gerais.....	43
4.7	Delineamento experimental.....	45
4.8	Avaliação da expressão de Arc por Western blotting.....	50
4.9	Análise estatística.....	51
5	RESULTADOS.....	52
5.1	Resultado 1: O efeito do tamoxifeno infundido no córtex PL e no CCA imediatamente ou 6 h após a reativação da memória recente de medo.....	52
5.2	Resultado 2: O aumento da expressão da proteína Arc no córtex PL após a reativação da memória de medo.....	55
5.3	Resultado 3: Efeitos da inibição da PKC no córtex PL pela queleritina na persistência da memória.....	57

5.4	Resultado 4: O prejuízo da persistência da memória induzido pela inibição da PKC no córtex PL requer reativação prévia da memória.....	60
5.5	Resultado 5: Efeitos da inibição de PKM ζ no córtex PL pelo ZIP na persistência de uma memória de medo contextual reativada.....	61
5.6	Resultado 6: O prejuízo da persistência da memória induzido pela inibição da PKM ζ no córtex PL requer reativação prévia da memória.....	63
5.7	Resultado 7: O prejuízo da persistência da memória induzido pela inibição da PKM ζ no córtex PL é independente do tempo decorrido entre a administração do ZIP e o Teste A1.....	64
5.8	Resultado 8: Efeitos da inibição da PKC do córtex PL pela queleritina na reconsolidação de uma memória de medo contextual reativada.....	66
5.9	Resultado 9: O prejuízo da reconsolidação da memória induzido pela inibição da PKC no córtex PL requer reativação prévia da memória.....	67
5.10	Resultado 10: Efeitos da inibição da PKM ζ do córtex PL pelo ZIP na reconsolidação de uma memória de medo contextual reativada.	69
6	DISCUSSÃO.....	71
6.1	O efeito do tamoxifeno infundido no córtex PL imediatamente ou 6 h após a reativação da memória recente de medo.....	72
6.2	O aumento da expressão da proteína Arc no córtex PL após a reativação da memória de medo.....	75
6.3	A atividade de PKC e PKM ζ é necessária para a persistência de uma memória reativada.....	76
6.4	A atividade de PKC é necessária para a reconsolidação de uma memória reativada.....	81
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
8	CONCLUSÃO.....	87
9	REFERÊNCIAS.....	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 AS MEMÓRIAS

As memórias podem ser caracterizadas por um evento fisiológico capaz de armazenar informações e acontecimentos ao longo da vida (DUDAI, 2002). Além disso, a memória é caracterizada como uma mudança no comportamento dos indivíduos em consequência de suas experiências prévias (CHARNIAK & MCDERMOTT, 1985). O aprendizado ocorre quando o indivíduo passa por experiências que levam a aquisição de informações e estabilização dos circuitos neuronais ativados, e as informações são enviadas a através de neurônios que se projetam a partir dos órgãos sensoriais para o sistema nervoso central (SNC; DUDAI, 2002).

A formação, o armazenamento e o uso das memórias são críticos para a realização de tarefas cotidianas, resolução de problemas e tomada de decisões. Além disso, a memória tem grande importância na psiquiatria e na psicologia por estar associada a transtornos mentais como o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT). Diante disso, é importante compreender os processos de formação, evocação, atualização, manutenção e o uso das memórias, pois elas podem produzir um impacto importante na vida do indivíduo como também na saúde mental (ALBERINI & LEDOUX, 2013).

1.2 O TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é uma doença psiquiátrica associada à exposição a um evento traumático extremo, como: agressão física, violência sexual, sequestro, ser mantido refém, ataque terrorista, tortura, encarceramento como prisioneiro de guerra, desastres naturais, acidentes automobilísticos graves, entre outros eventos que podem ameaçar a vida do indivíduo (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013). Durante o evento traumático extremo ocorre a formação da memória traumática, e um desequilíbrio no processo de formação e no uso da memória, pode ser um dos fatores essenciais para o desenvolvimento do TEPT (MICHPOULOS et al., 2015).

Pacientes com TEPT costumam apresentar lembranças intrusivas (por exemplo: flashbacks, sonhos etc.), sensação de recorrência do estresse, intenso desconforto frente a estímulos que lembrem o evento, hipervigilância, entorpecimento emocional, entre outros sinais e sintomas (JANICAK et al., 2006). Este transtorno pode ocorrer em qualquer idade a partir do primeiro ano de vida. Os sintomas geralmente se manifestam dentro dos primeiros três meses depois do trauma, embora possa haver um atraso de meses, ou até anos, antes de os critérios para o diagnóstico serem atendidos (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013).

Atualmente não se tem um tratamento específico e efetivo para o TEPT. Clinicamente o tratamento do TEPT é realizado com o uso de fármacos antidepressivos com atividade serotoninérgica como por exemplo a sertralina. Esta classe de fármacos apresenta uma baixa eficácia, pois parte dos pacientes tem dificuldade na adesão ao tratamento motivados pelos vários efeitos adversos como distúrbios gastrointestinais, aumento da ansiedade no início do tratamento, disfunção sexual, entre outros (JANICAK et al., 2006). Além disso as drogas serotoninérgicas não são capazes de interferir nos mecanismos que sustentam as memórias e, portanto, novas abordagens farmacológicas são necessárias no tratamento do TEPT. A possibilidade de realizar alterações na memória tem surgido como uma oportunidade terapêutica para modular as memórias que estão relacionadas com transtornos psiquiátricos, como por exemplo o TEPT (PARSONS & RESSLER 2013). Entretanto, há uma carência de estudos que abordam os mecanismos de manutenção das memórias após a sua reativação.

1.3 A CONSOLIDAÇÃO DAS MEMÓRIAS

Inicialmente as conexões neurais recrutadas para a formação da memória estão em um estado lábil (são vulneráveis e passíveis de interferências) e são estabilizadas gradualmente ao longo do tempo, através de um fenômeno conhecido como consolidação da memória. A consolidação permite que a memória seja estabilizada gradativamente através de mecanismos moleculares recrutados ou envolvidos, como a potenciação de longa duração (LTP, HEBB, 1949; BROWN, et al., 1988; BLISS & LOMO, 1973) que é um dos principais mecanismos moleculares da consolidação. A LTP induz um aumento na efici-

ência da transmissão sináptica a partir de estímulos tetânicos, levando ao fortalecimento dos circuitos neuronais ativados (BEAR, 1996).

O processo de consolidação é um fenômeno dinâmico que leva certo tempo para se completar, sendo observado um período mínimo de 6 horas necessário para a consolidação de vários tipos de memórias (MCGAUGH, 2000). Este intervalo de tempo é conhecido como janela de consolidação e é crítico para a estabilização das memórias e se inicia a partir do momento em que as informações chegam às estruturas cerebrais como amígdala e hipocampo, responsáveis por processar as memórias emocionais (NADER et al., 2000). Este período pode ser subdividido em duas fases, sendo a primeira conhecida como fase inicial onde ocorre um aumento dos processos que favorecem a excitabilidade neuronal (BALTAÇI et al., 2019). A segunda fase é conhecida como fase tardia, onde há um aumento dos processos que mantêm as alterações neuronais que foram induzidas pela LTP (BALTAÇI et al., 2019). Além disso, outro mecanismo que participa na manutenção destas memórias é o mecanismo de persistência.

Na LTP ocorrem modificações nos circuitos neuronais que foram recrutados na aquisição de forma persistente, com envolvimento primordial de sinapses glutamatérgicas e dos receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e N-metil D-Aspartato (NMDA). A ativação dos receptores AMPA - essenciais para a transmissão sináptica basal - é promovida pela ação do glutamato liberado a partir da estimulação tetânica do neurônio pré-sináptico, que em conjunto pode gerar uma ação prolongada, sendo ativados os neurônios pré-sináptico e pós-sináptico simultaneamente (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993). Deste modo, ocorre um aumento no influxo de sódio (Na^+) intracelular, promovendo a ativação dos receptores glutamatérgicos NMDA, onde ocorre a remoção do íon magnésio (Mg^{2+}) do canal iônico. Com a abertura do canal, tem-se um maior influxo de cálcio (Ca^{2+}) para o neurônio pós-sináptico (NOWAK et al., 1984; ASCHER & NOWAK, 2009; BLISS & COLLINGRIDGE, 1993).

O glutamato presente na fenda sináptica, liga-se aos receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs), que ativam a proteína Gq, e posteriormente ocorre a ativação da fosfolipase C. A fosfolipase C hidrolisa o fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2), formando o diacilglicerol (DAG) e inositol trifostato

(IP₃). O Ca²⁺ presente no citoplasma liga-se a proteína quinase II dependente de Ca²⁺ (CaMKII) que juntamente com o DAG se ligam a proteína quinase C (PKC). Além disso o DAG participa da fosforilação do AMPA e dos receptores mGluRs de glutamato (BARRIA et al., 1997).

A CaMKII e a proteína quinase C (PKC) participam da fosforilação e da ativação de proteínas como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), as proteínas quinase dependente de AMPc (PKA), além de fosforilar a proteína 43 associada ao crescimento (*growth associated protein 43*, GAP-43), que contribui para o fortalecimento da transmissão glutamatérgica ao participar da mobilização das vesículas sinápticas (ROUTTENBERG et al., 2000).

A PKC também medeia a fosforilação da proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB), um fator de transcrição responsável pela indução da síntese de novas proteínas (ROBERSON et al., 1999). O CREB se liga ao DNA, em uma região onde está presente os promotores de um conjunto de genes específicos, entre os quais podemos destacar o grupo de genes de expressão imediatos como a proteína Arc (YAMAMOTO et al., 1990).

A Arc possui uma função estrutural capaz de contribuir para alterações nos padrões da atividade neuronal, que levam a plasticidade sináptica em regiões cerebrais como o hipocampo, amígdala e córtex (RAO et al., 2006; KORB, FINKBEINER, 2011). Após a indução da LTP, o RNAm da Arc se desloca para dendritos, onde se localiza a actina no citoesqueleto, e em conjunto com a proteína de sinalização ERK promove a transcrição e a tradução da Arc (STEWART et al. 1998; PANJA et al. 2009). Desse modo a expressão precoce da Arc depende da atividade neuronal (NAKAYAMA et al., 2015). A síntese da Arc é necessária para a expansão da rede de actina, o que é necessário para a manutenção da fosforilação do fator de iniciação da tradução (eIF4E). Durante a consolidação, a LTP precisa de síntese de Arc no giro dentado (em memórias dependentes de hipocampo), iniciando a partir de 10 minutos da estimulação tetânica, com duração de 2 a 4 h (GUZOWSKI et al., 1999; MESSAOUDI et al., 2007).

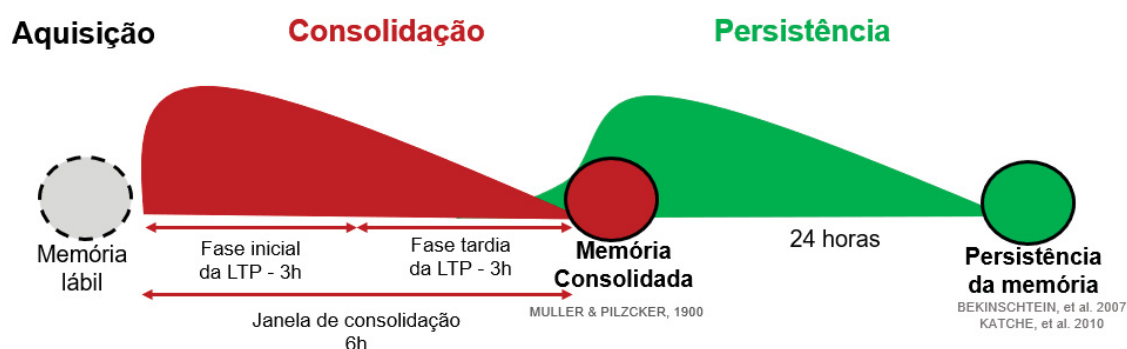
1.4 A PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA

Ao ser consolidada, a memória pode permanecer ao longo da vida do indivíduo. Estudos têm mostrado em alguns paradigmas o fenômeno da persistência da memória. Estes mecanismos adjacentes a fase tardia da consolidação da memória requer ondas tardias de síntese de proteínas para sustentar e manter as memórias de longo prazo. Diferente da consolidação, a janela da persistência da memória pode se estender por um período prolongado e pode permanecer por até 30 dias (SHEMA et al., 2007). Um estudo revelou que a inibição de c-Fos ou a inibição da expressão do RNAm de c-Fos no hipocampo prejudica a persistência da memória de longo prazo, sem prejudicar a formação da memória (KATCHE et al., 2010), da mesma forma a inibição da síntese de proteínas 12 horas após a aquisição prejudica apenas a persistência da memória espacial de ratos, sem afetar a sua consolidação (BEKINSCHTEIN et al., 2007). Juntos, estes dados indicam que o processo de persistência apresenta mecanismos ou decursos temporais diferentes da consolidação.

Estudos evidenciam que a superexpressão da isoforma atípica da PKC, conhecida como proteína quinase M zeta (PKM ζ), aprimora a LTP e a memória de longo prazo (SHEMA et al., 2011 ; XUE et al., 2015 ; SCHUETTE et al., 2016). Além disso, a concentração da proteína PKM ζ aumenta persistentemente por um longo período de tempo (SACKTOR et al., 1993; HSIEH et al., 2017). Ao inibir a isoforma PKM ζ utilizando o peptídeo zeta inibitório (ZIP), podem ocorrer alterações em traços de memória já estabilizados (GLANZMAN 2013). Serrano et al., (2008) relataram que o ZIP pode prejudicar a memória de longo prazo na esquiva ativa, quando administrado no hipocampo dorsal ou na amígdala basolateral (BLA) 2 horas antes do teste da memória recente. Além disso o estudo mostrou que a persistência de memórias adquiridas no labirinto radial, no labirinto aquático de Morris, na esquiva inibitória, e no medo contextual também foram prejudicadas quando foi administrado o ZIP no hipocampo dorsal ou na BLA (SERRANO et al., 2008). Ademais, outro estudo utilizando camundongos nocaute para a PKM ζ no hipocampo demonstrou que estes animais apresentam um prejuízo na manutenção da LTP e que há um prejuízo na memória de longo prazo anteriormente estabelecida (WANG et al., 2016). A expressão e atividade da PKM ζ aumentam o número de receptores AMPA con-

tendo a subunidade GluA2, o que facilita o tráfego dos receptores AMPA-GluA2 e inibe a remoção dos mesmos da membrana sináptica (YAO et al., 2008; LA-FERRIÈRE et al. 2011). O AMPA contendo GluA2 é um subtipo de receptor impermeável ao Ca^{2+} , ao contrário do receptor AMPA contendo GluA1, que é permeável ao Ca^{2+} (YAO et al., 2008).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PROCESSOS DE FORMAÇÃO E PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA



Após a o processo de aquisição da memória, circuitos sinápticos específicos são ativados para manter as memórias ao longo do tempo. A estabilização dos circuitos sinápticos, é dependente da consolidação. O processo de consolidação é dependente da LTP e pode ser dividido em duas fases, sendo a fase inicial da LTP e a fase tardia da LTP (em vermelho). Na fase tardia da LTP mecanismos responsáveis pela persistência da memória começam a ser desencadeados. Neste momento, ondas tardias de síntese de proteínas são iniciadas, promovendo a manutenção das memórias ao longo da vida do indivíduo. A persistência da memória, inicia-se na fase tardia da LTP e ondas de síntese proteicas ocorrem após o processo de consolidação com o intuito de sustentar os mecanismos da persistência da memória (em verde).

1.5 A RECONSOLIDAÇÃO DAS MEMÓRIAS

Após o processo de consolidação, as memórias podem ser evocadas e expressas através da fala ou do comportamento dos indivíduos. Até os anos 2000, acreditava-se que após o processo de consolidação, as memórias não poderiam ser modificadas. No entanto, estudos relatam que as memórias ao serem evocadas podem ser reativadas, tornando-se lábeis novamente, o que as torna susceptíveis a interferências (PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997; NADER et al., 2000). Hoje se sabe que após a evocação e reativação as memórias passam por uma nova etapa de estabilização denominada reconsolidação da memória.

O processo de reconsolidação tem sido considerado o principal mecanismo de atualização e manutenção das memórias a longo prazo, e, portanto, pode ser uma grande oportunidade terapêutica para modificar memórias aversivas (KIDA, 2019). Desta forma, a reconsolidação pode ser uma opção interessante para possíveis interferências na memória de medo, sendo de grande importância clínica para possíveis tratamentos para o TEPT.

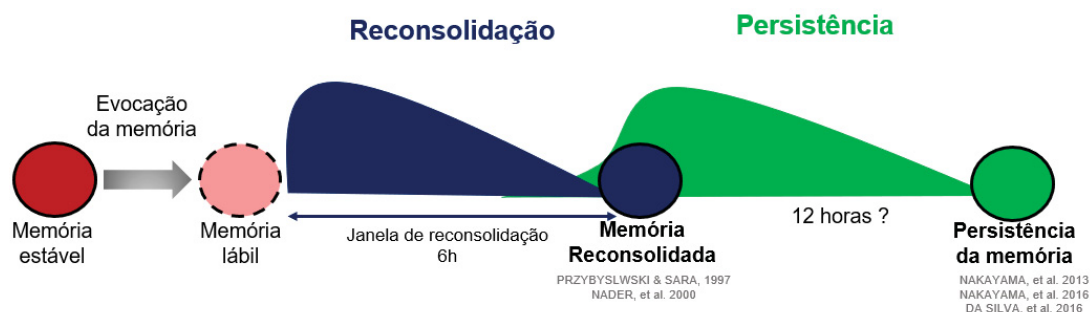
Sugere-se que o processo de reconsolidação é desencadeado a partir da ativação de receptores AMPA e NMDA, e é necessário que novas proteínas sejam sintetizadas para que a memória possa ser reestabilizada (NADER et al., 2000; NIKITIN et al., 2015). O período em que os mecanismos da reconsolidação ocorrem é de até 6 horas após a reativação e interferências realizadas após este período não são capazes de alterar o traço de memória original através da reconsolidação (GAZARINI et al., 2013; DE LA FUENTE et al., 2015). Diversos estudos demonstraram interferências na expressão das memórias através de interferências na reconsolidação, tais como: Przybylski & Sara em 1997 demonstrou que um traço de memória espacial pode ser enfraquecido utilizando um antagonista dos receptores NMDA (MK-801) após a evocação de uma memória espacial. Outro trabalho destacou que uma memória de medo pode ser enfraquecida de maneira duradoura utilizando a anisomicina, um inibidor de síntese de proteínas, quando infundido na BLA após a evocação (NADER et al. 2000). Outros estudos também relataram que a administração de drogas como o midazolam, o canabidiol e o propranolol após a reativação da memória prejudicam a reconsolidação (DĚBIEC & LEDOUX, 2004; STERN et al., 2012; GAZARINI et al., 2013). O que esses trabalhos têm em comum é que nenhum deles observou efeito da administração das drogas 6 horas após a reativação. No entanto, os animais foram testados apenas após 24 horas e, portanto, não se tem dados de uma reexposição tardia para avaliar os efeitos sobre a persistência da memória reativada.

No entanto, um estudo revelou que a inibição da síntese de proteínas na BLA 9,5 horas após a reativação da memória, prejudicou a memória de medo dos animais após 7 dias, mas não quando testados 2 dias após a evocação da memória. Neste estudo, também foi avaliado a administração do inibidor de síntese proteica 5 e 24 horas após a reativação da memória, porém não foram observadas diferenças significativas (NAKAYAMA et al., 2013). Posteriormente,

foi demonstrado que um aumento da expressão da proteína Arc em neurônios da região CA1 do hipocampo após a reativação da memória de medo em camundongos, e que a expressão tardia da proteína Arc participa da regulação da persistência das memórias de medo reativadas (NAKAYAMA et al. 2015). Neste trabalho, também foi demonstrado que na BLA a Arc retorna a sua expressão basal 6 horas após a reativação, e 12 horas depois ocorre uma nova onda de síntese de Arc (NAKAYAMA et al. 2015). Além disso, este grupo de pesquisadores mostraram que a expressão tardia de Arc na BLA é essencial para a persistência de memórias do medo contextual recém adquiridas e reativadas (NAKAYAMA et al. 2016).

Nesse mesmo sentido, um trabalho do nosso grupo revelou que a administração do tamoxifeno, um modulador dos receptores de estrogênio, mas que também inibe a proteína quinase C (PKC), prejudicou a persistência da memória reativada no paradigma do medo ao contexto. Neste trabalho mostramos que a administração intraperitoneal de tamoxifeno 6 e 9 horas após a reativação, prejudicou especificamente a persistência da memória de medo quando os animais foram testados 7 dias mais tarde, mas que após 24 horas essa memória mantinha-se intacta. Além disso, um grupo independente de animais tratados com tamoxifeno 6 horas após a reativação confirmou o prejuízo na persistência desta memória (teste realizado 7 dias mais tarde) e este prejuízo foi mantido quando os animais foram re-testados passados 21 dias. Também demonstramos que para ocorrer interferências na persistência da memória aversiva após a reativação são necessários os processos de evocação e labilização (DA SILVA et al., 2016). Esses dados sugerem que a reativação da memória também contribui para a persistência, e não apenas para a reconsolidação, expandindo a janela temporal que pode ser alvo de tratamentos para o TEPT, por exemplo.

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PROCESSOS DE RECONSOLIDAÇÃO E PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA



Inicialmente acreditava-se que os processos de aquisição e consolidação das memórias, seriam as únicas etapas em que a memória poderia ser modificada (círculo vermelho). Porém a teoria da reconsolidação gerou uma nova linha de pesquisa modificando a visão de que a memória seria um processo estático podendo ser modificada após a evocação. Atualmente observa-se que a evocação (seta cinza) e labilização da memória (círculo rosa) geram ondas distintas de síntese proteica que sustentam a reconsolidação (em azul) e persistência da memória ao longo do tempo (em verde).

1.6 A PROTEÍNA QUINASE C

A proteína quinase C (PKC) pertence a uma família de isoenzimas que participam da mediação e da sinalização intraneural. Inicialmente a PKC foi descrita e denominada por Takai e colaboradores sendo primeiramente identificada no fígado de ratos (TAKAI et al., 1977a), no cerebelo de bovinos (TAKAI et al., 1977b) e no citosol do cérebro de ratos (INOUE et al., 1977).

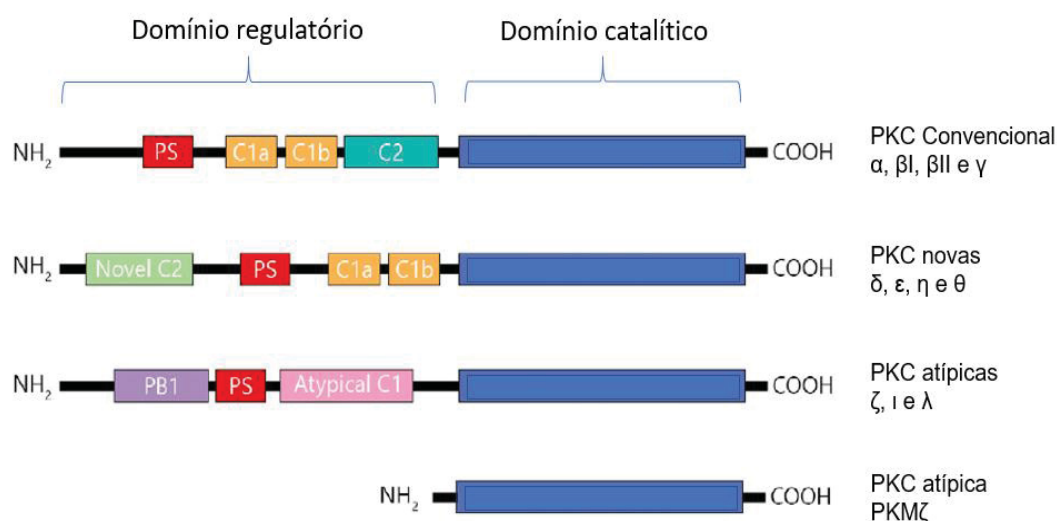
A PKC é encontrada em grande quantidade no cérebro e em outros tecidos de mamíferos, como também de invertebrados (NISHIZUKA, 1988; NOGUES, 1996). A PKC, está associada a regulação da excitabilidade neuronal, liberação de neurotransmissores, expressão gênica e plasticidade sináptica (NISHIZUKA, 1988). Geralmente presente de forma inativa no citosol, é ativada de maneira reversível por ligação ao fosfolípido de membrana na presença de Ca^{2+} (TAKAI et al., 1979). Além disso, o diacilglicerol (DAG) aumenta significativamente a afinidade dessa enzima por Ca^{2+} e fosfolípido (TAKAI et al., 1979; KISHIMOTO et al., 1980). A partir da ligação específica da PKC pelo DAG, que é transitoriamente formado na membrana, a ativação da PKC é acompanhada de sua translocação do citosol para a membrana plasmática (KAWAHARA et al., 1980). A duração e magnitude do sinal do DAG determina a ativação de PKC na membrana celular.

Além disso, a modulação da PKC envolve outros mecanismos. Foi mostrado que a PKC sofre autofosforilação (KIKKAWA et al 1982; HUANG et al., 1986), e portanto este mecanismo pode contribuir para o aumento da afinidade da PKC pelo DAG sendo importante na regulação da atividade subsequente à transdução de sinal *in vivo* (BORNER et al 1989). A PKC também pode ser ativada por ésteres de forbol, que se integram à membrana celular, competem com o DAG pelo mesmo local de ligação e ativam PKC de maneira semelhante (CASTAGNA et al., 1982), aumentando assim a afinidade da enzima por Ca^{2+} . Além disso os ésteres de forbol, como o DAG, causam a translocação da PKC para membranas (KRAFT et al., 1982; KRAFT E ANDERSON, 1983). Também foi demonstrado que ácidos graxos insaturados, produzidos a partir de fosfolipídios pela ação da fosfolipase A2, foram capazes de ativar a PKC (MCPHAIL et al., 1984; MURAKAMI e ROUTTENBERG, 1985). Assim, pode-se observar que mecanismos distintos podem contribuir para a ativação e modulação da PKC, através de vias complexas de sinalização intracelular (LIU, 1996).

A PKC era considerada uma única proteína (INOUE et al., 1977), contudo, estudos posteriores a revelaram como uma família heterogênea de quinasas dependentes de fosfolipídios que podem ser divididas em três categorias, com base no cofator requerido para ativação e sua estrutura (JAKEN, 1996). As PKC's convencionais α , β I, β II e γ , foram identificadas em genomas de bovinos, humanos e ratos em 1986 (COUSSENS et al., 1986) e no genoma de coelho em 1988 (OHNO et al., 1988) e requerem cálcio e DAG ou éster de forbol como cofatores. As PKC's novas δ , ϵ , η e θ , (LIU & HECKMAN, 1998) necessitam apenas de DAG ou éster de forbol. A terceira classe das PKC's, são as atípicas ζ , ι e λ (SACKTOR et al., 1993) e não requerem cálcio ou DAG para sua ativação.

Todas as PKC's possuem em sua estrutura um domínio regulatório amino-terminal contendo sítios de ligação ao fosfolipídio e éster de forbol, exceto as PKC's atípicas. Este domínio é separado do domínio terminal catalítico contendo os locais de ligação ao ATP. O DAG produzido através de hidrólise fosfolipídica, regula as atividades das PKC's convencionais e novas. A regulação da atividade das PKC's atípicas ainda não é muito bem conhecida.

FIGURA 3 - FIGURA ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA QUIINASE C (PKC)



Fonte: Adaptado de CHAU & LAU, 2020.

Figura esquemática da estrutura das isoformas da proteína quinase C (PKC). A família PKC pode ser subdividida em três classes, de acordo com a composição do domínio. Todos os membros da PKC contêm um domínio terminal C (azul). As PKC's convencionais (α, βI, βII e γ) contêm um domínio de pseudo-substrato (PS, retângulo vermelho), domínios C1 consecutivos (laranja) que se ligam a diacilglicerol e fosfatidilserina e um domínio C2 de ligação a Ca^{2+} (verde). As novas PKC's (δ, ε, η e θ) conservaram domínios C1, mas um domínio C2 "novo" (ciano) que não liga Ca^{2+} . PKC's atípicas (ζ e ι / λ) apresentam um domínio PB1 (roxo) para interação proteína-proteína e um domínio C1 "atípico" (rosa) que não tem afinidade com diacilglicerol ou fosfatidilserina. a PKMζ é uma forma modificada de PKCζ que não possui os domínios reguladores do terminal N.

A PKC ativada participa de muitos papéis biológicos, como o crescimento e diferenciação celular a oncogênese e inflamação. DeRiemer et al., (1985) evidenciaram de que a ativação da PKC endógena ou a injeção intracelular da enzima purificada aumentou a corrente sensível ao cálcio em neurônios de *aplysia*. Routtenberg et al. (1985), para esclarecer melhor o papel da PKC na ação neuronal, estudaram o efeito do éster de forbol em fatias do hipocampo de ratos. Então mostraram que o éster de forbol bloqueou a hiperpolarização tardia provocada pela estimulação sináptica, sugerindo que a PKC regula a condutância da membrana, possivelmente através da translocação da PKC. Desse modo, a PKC poderia ser um regulador da excitabilidade neuronal. Posteriormente, estudos relacionando a atividade da PKC com os mecanismos de plasticidade e memória começaram a surgir (ROUTTENBERG et al., 1985).

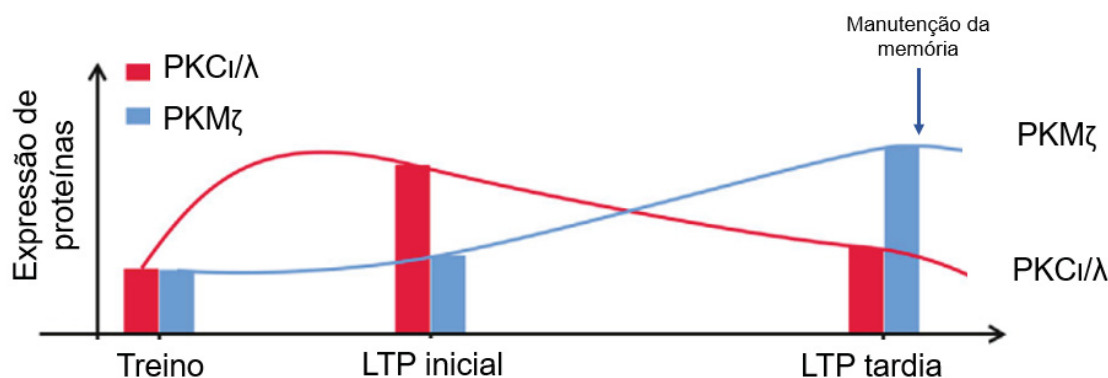
Outro trabalho relatou que a infusão de PKC na região CA1 do hipocampo promoveu um aumento da LTP (HU et al., 1987). Akers e colaboradores constataram que 1 hora após a indução da LTP, a atividade da PKC aumentou duas vezes nas membranas e diminuiu proporcionalmente no citosol, sugerindo a translocação da PKC (AKERS et al., 1986). Além disso, foi proposto que a estimulação tetânica das sinapses do hipocampo ativa a PKC, e a indução da LTP foi acompanhada da ativação persistente da PKC, que está diretamente relacionada à persistência da plasticidade sináptica (AKERS et al., 1986).

A distribuição da PKC no hipocampo de mamíferos desempenha um papel crucial nos processos de aprendizagem e armazenamento da memória e estudos evidenciaram a participação da PKC nestes mecanismos. Burchuladze et al., (1990), relataram que a formação da memória em pintinhos, depende da PKC ligada à membrana. Além disso, outro estudo mostrou que ocorre a ativação persistente da PKC durante o desenvolvimento da facilitação a longo prazo em *aplysia* (SOSSIN et al 1994). Adicionalmente outros trabalhos surgiram confirmando o papel da PKC nos mecanismos de formação e manutenção da memória, como na memória espacial onde as concentrações de isoformas de PKC do hipocampo em ratos jovens e idosos foram relatadas (COLOMBO, et al 1997). Foi avaliado no labirinto aquático, as relações entre a aprendizagem espacial e as concentrações hipocámpais das isoformas de PKC α , β e γ , entre os ratos jovens foi observado que aqueles com melhor memória espacial foram os que apresentaram as maiores concentrações de PKC γ e de PKC β II. Já entre os animais idosos apresentaram concentrações aumentadas de PKC γ no hipocampo (COLOMBO, et al 1997). Nos anos 2000, foi mostrado o papel da PKC α , e β na amígdala basolateral (BLA) que são críticas para a consolidação da memória na esQUIVA inibitória em ratos (BONINI, et al. 2005). Posteriormente foi relatado a participação da PKC do hipocampo na aquisição, consolidação e reconsolidação de memória espacial na tarefa de aprendizado do labirinto aquático de Morris (BONINI, et al 2007).

Tem sido proposto que as PKC's atípicas possuem um papel importante nas fases iniciais e tardias da LTP. Sendo assim, a PKC ι/λ é necessária para as fases iniciais da formação da memória (SACKTOR & HELL, 2017) e essa função está relacionada à sua capacidade de aumentar o tráfego de receptores AMPA que contêm a subunidade GluA1 na zona de densidade sináptica (PSD;

BORODINOVA et al., 2017). Já a PKM ζ é importante na LTP tardia e é necessária para a persistência da memória, pois é uma quinase constitutivamente ativa e aumenta no citosol durante o estágio de manutenção da memória a longo prazo (SACKTOR, 2012).

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA EXPRESSÃO DAS PKC's ATÍPICAS DURANTE A LTP



Fonte: Adaptado de WANG et al., 2016.

As PKC's atípicas participam das fases iniciais e tardias da LTP. A isoforma atípica PKC ι/λ é expressa e é necessária para as fases iniciais da formação da memória (em vermelho). Sua função está relacionada ao aumento do tráfego de receptores AMPA que contêm a subunidade GluA1 na zona de densidade sináptica (PSD). A PKM ζ tem sua expressão aumentada no citosol e possui um papel primordial na fase tardia da LTP, sendo necessária para a persistência da memória (em azul).

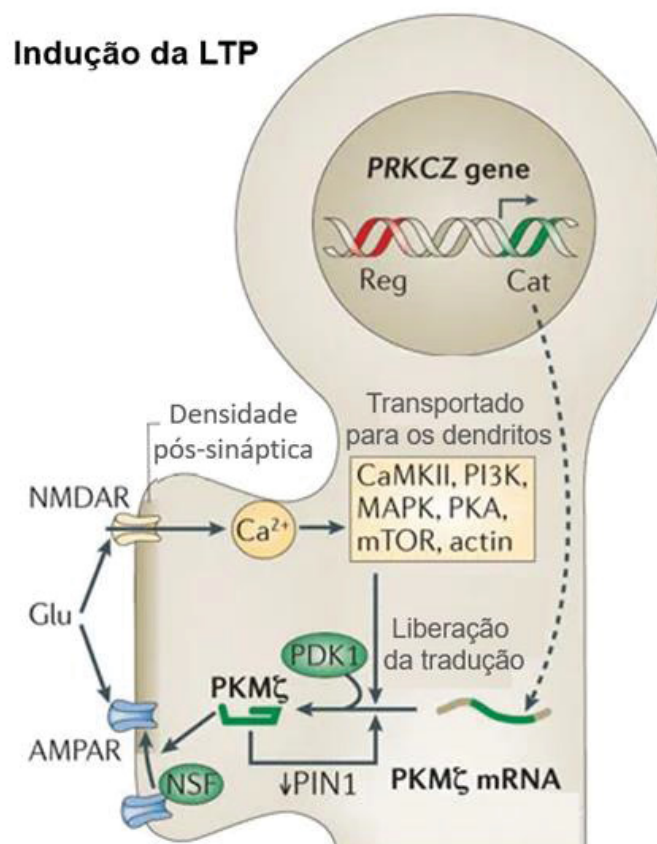
1.7 A PKM ζ

Conforme a classificação das PKC's, a PKM ζ é uma isoforma atípica (SACKTOR et al, 1993; HERNANDEZ et al, 2003). Uma vez sintetizada, a proteína permanece ativa até sua degradação. Sacktor et al., (1993) sugeriram que a PKM ζ poderia ter um papel essencial no mecanismo de manutenção da memória a longo prazo. Foi demonstrado que a PKM ζ tem um papel significativo na manutenção da modificação sináptica associada à aprendizagem, mostrando que a interferência na função normal da PKM ζ altera a manutenção da LTP (LING et al, 2006; PASTALKOVA et al., 2006 SERRANO et al., 2008). A PKM ζ é considerada uma proteína relacionada à plasticidade (PRP) específica da LTP, que mantém a LTP nos dendritos apicais e regula a indução dos pro-

cessos tardios da LTP, bem como o processo de marcação sináptica nos dendritos basais (SAJIKUMAR et al., 2005). Além disso a PKM ζ participa dos processos de manutenção da memória através da sua influência no tráfego de receptores de AMPA. A migração de receptores AMPA para as membranas pós-sinápticas é um mecanismo importante para plasticidade e aprendizado sinápticos (KESSELS & MALINOW, 2009). Portanto interromper esta quinase atípica pode prejudicar a persistência da memória, sem afetar a sua formação.

De fato, foi demonstrado que a inibição farmacológica da PKM ζ pelo peptídeo zeta inibitório (ZIP), levou ao prejuízo da memória de longo prazo na memória espacial, do medo condicionado, da esquiva inibitória e da aversão ao sabor (SERRANO et al., 2008; SHEMA et al., 2007; 2011). Também já foi mostrado que ao interromper a atividade da PKM ζ na amígdala 24 horas após um treino, prejudica a manutenção da memória do medo auditivo (MIGUES et al., 2010). Além disso, já foi reportado que ao prejudicar a atividade da PKM ζ na amígdala pode ocorrer alteração na memória de medo em ratos e pode levar à redução da densidade pós-sináptica dos receptores AMPA contendo a subunidade GluA2.

FIGURA 5 - O MECANISMO DE MANUTENÇÃO DA MEMÓRIA SUBJACENTE A LTP MEDIADO PELA PKM ζ



Fonte: Adaptado de SACKTOR, 2012.

A partir do gene da proteína quinase C, zeta (PRKC ζ) presente nos neurônios ocorre a indução de um promotor interno que produz o mRNA da proteína quinase M (PKM ζ) que codifica um domínio catalítico, sem um domínio regulador. O RNAm da PKM ζ é transportado para os dendritos. Durante a indução de potenciação a longo prazo (LTP), várias vias de sinalização estimuladas por receptores NMDA são necessários para liberar o bloqueio da tradução. Uma vez sintetizado, a PKM ζ se liga e é fosforilada pela proteína quinase 1 dependente de fosfoinositida (PDK1), o que aumenta a atividade desta quinase constitutiva. A PKM ζ potencializa as respostas dos receptores AMPA, aumentando o número de receptores na densidade pós-sináptica através da ação do fator sensível à proteína N-etilmaleimida (NSF). CaMKII, Ca²⁺/ proteína quinase II dependente de calmodulina; Glu, glutamato; MAPK, proteína quinase ativada por mitogênio; mTOR, alvo de rapamicina em mamíferos; PI3K, fosfatidilinositol 3-cinase; PKA, proteína quinase A.

1.8 O CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL

O neocórtex é uma estrutura altamente organizada presente em todos os mamíferos que processa informações sensoriais, motoras, de linguagem, emocionais e associativas (ROCKLAND, 2015). Entre estes, várias regiões corticais como córtex pré-frontal medial (CPFm) possui um papel primordial nos processos de consolidação, reconsolidação e persistência de memórias (SCHLICHTING & PRESTON, 2016; GONZALES et al., 2014). O CPFm de ratos é subdividido em três principais regiões, o córtex cingulado anterior (CCA), o córtex pré-límbico (córtex PL) e o córtex infralímbico (córtex IL; HOOVER & VERTES, 2007). Estudos evidenciam que essas três porções do CPFm possuem um papel de controle dos comportamentos associados à expressão do medo, ou seja, enquanto a atividade do CCA e do PL aumentam a expressão do medo, a atividade do IL tem efeitos contrários (HEIDBREDEDER & GROENEWEGEN, 2003).

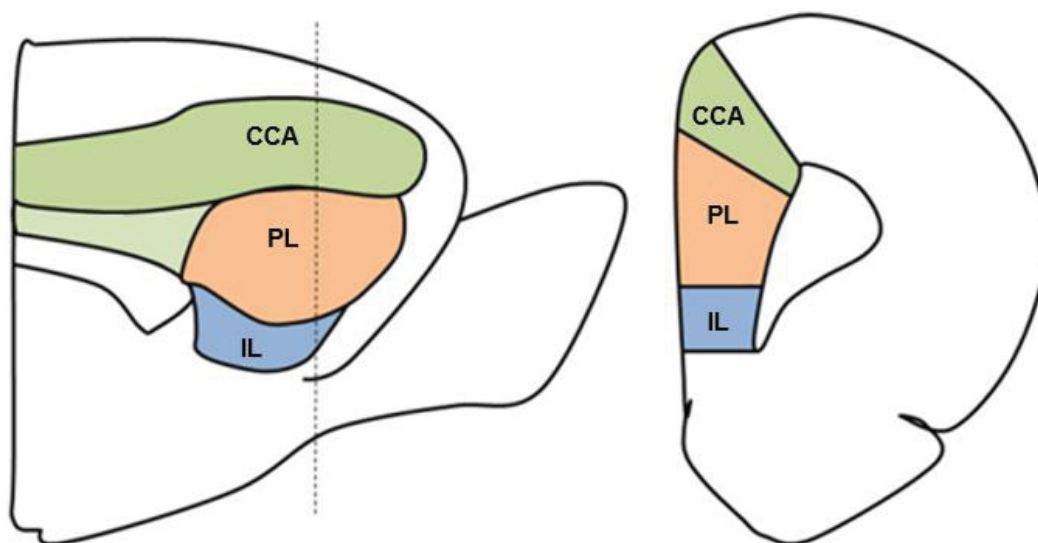
A região do córtex PL está implicada na reconsolidação de respostas condicionadas ao medo. O córtex PL recebe e envia projeções para a região CA1 do hipocampo dorsal, além de enviar projeções para a amígdala basolateral (VERTES, 2004; HOOVER & VERTES, 2007). O córtex IL está relacionado com a facilitação da extinção, reduzindo a expressão da memória de medo (BURGOS-ROBLES et al., 2009; PETERS et al., 2009) e projeta-se para os núcleos da amígdala através de sinapses com as células intercalares da amígdala, as quais são neurônios GABAérgicos inibitórios. A região do córtex ACC recebe e envia projeções para o hipocampo dorsal e BLA, além de participar dos mecanismos de consolidação, e reconsolidação da memória remota (FRANKLAND et al. 2006, DENARDO et al., 2019; MAKINO et al., 2019).

A ativação do CPFm e, consequentemente, a atividade da BLA orquestram as respostas ao medo condicionadas durante os processos de reconsolidação. Supostamente, durante a reconsolidação da memória de medo, o aumento da atividade da BLA juntamente com as projeções hipocámpicas, controla a atividade do córtex PL (HERRY et al., 2008). Stern et al., (2014) revelou que a atividade do córtex PL participa da reconsolidação da memória do medo ao longo do tempo. A infusão de muscimol no córtex PL prejudicou a reconsolidação da memória do medo contextual, quando realizadas imediatamente após a

reativação, além disso ao infundir muscimol no córtex IL após a reativação não houve prejuízo da reconsolidação da memória do medo, como visto em animais inativados no córtex PL. Ademais, a expressão de Zif268, um produto de um gene precoce imediato relacionado à reconsolidação de memória aumenta nos córtex PL e CCA, mas não no córtex IL, após uma breve reativação da memória de medo (STERN et al., 2014). Usando um paradigma olfativo de condicionamento do medo, Do Monte et al. (2013) estudaram o envolvimento de duas sub-regiões do CPFm, a região do córtex PL e o córtex CCA. Os resultados revelaram que o bloqueio de receptores $\alpha 1$ - adrenérgicos no PL após a recuperação da memória de medo, prejudicou a reconsolidação da memória, enquanto o mesmo tratamento realizado no CCA não afetou a reconsolidação da memória recente (DO MONTE et al., 2013).

O córtex PL de ratos é homólogo ao córtex cingulado anterior dorsal (CCAd) em humanos e estudos neuroimagem por tomografia ou ressonância magnética, mostram que pacientes com TEPT apresentam uma hiperativação dessa região (FANI et al., 2012; PITMAN et al., 2012; ROUGEMONT-BÜCKING et al., 2011). Além disso outro estudo relatou que as anormalidades funcionais do CCAd, está positivamente correlacionada com a gravidade dos sintomas do TEPT (FONZO et al., 2010).

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CORTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL



Fonte: Adaptado de MCKLVEEN et al., 2015.

Neuroanatomia do córtex pré-frontal medial (CPFm). Seções sagitais (esquerda) e coronal (direita) do CPFm demonstrando o córtex cingulado anterior (CCA), pré-límbico (PL) e córtex infralímbico (IL). A linha pontilhada na vista sagital indica a localização da seção coronal.

2. HIPÓTESE

Em humanos com TEPT, o CCAd está hiperativado, contribuindo para o aumento da expressão do medo (FANI et al., 2012; PITMAN et al., 2012). Ainda, estudos *post-mortem* em encéfalos de vítimas de suicídio encontraram um aumento na expressão de PKC, no córtex frontal (CHOI et al., 2011). Em roedores, a região homóloga ao CCAd é o córtex PL (STEFANACCI & AMARAL, 2002), uma região importante para a reconsolidação e persistência da memória de medo (STERN et al., 2014; XUE et al., 2015). Com base no exposto e na importância da PKC para o processo de formação e persistência da memória, a hipótese desse projeto é que a atividade das proteínas PKC e da isoforma atípica PKM ζ no córtex PL estariam envolvidas com a reconsolidação e persistência da memória induzida pela reativação.

3. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi investigar o papel da PKC e da PKM ζ presentes no córtex PL na reconsolidação e na persistência da memória de medo contextual em ratos após a reativação.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tamoxifeno administrado no córtex PL imediatamente após a reativação da memória de medo ao contexto.
- Avaliar o efeito do tamoxifeno administrado no córtex PL 6 horas após a reativação da memória de medo ao contexto.
- Avaliar o efeito do tamoxifeno administrado no CCA imediatamente após a reativação da memória de medo ao contexto.
- Avaliar o efeito do tamoxifeno administrado no CCA 6 horas após a reativação da memória de medo ao contexto.
- Avaliar a expressão de Arc no córtex PL em diferentes momentos após a reativação da memória.
- Avaliar o efeito da queleritrina administrada no córtex PL 6 horas após a reativação da memória de medo ao contexto.
- Avaliar o efeito da queleritrina administrada no córtex PL 9 horas após a reativação da memória de medo ao contexto.
- Avaliar o efeito da queleritrina administrada no córtex PL 12 horas após a reativação da memória de medo ao contexto.
- Avaliar o efeito da queleritrina administrada no córtex PL 18 horas após a reativação da memória de medo ao contexto.
- Avaliar o efeito da queleritrina administrada no córtex PL 6 horas após a omissão da reativação da memória de medo ao contexto.

- Avaliar o efeito do ZIP administrado no córtex PL 6 horas após a reativação da memória de medo ao contexto.
- Avaliar o efeito do ZIP administrado no córtex PL 6 horas após a omissão da reativação da memória de medo ao contexto.
- Avaliar o efeito do ZIP administrado no córtex PL 6 horas após a reativação da memória de medo ao contexto.
- Avaliar se o efeito do ZIP administrado no córtex PL 6 horas após a reativação da memória de medo ao contexto é independente do tempo decorrido entre a administração de ZIP e o Teste A₁.
- Avaliar o efeito da queleritrina administrada no córtex PL imediatamente após a reativação da memória de medo ao contexto.
- Avaliar o efeito da queleritrina administrada no córtex PL imediatamente após a omissão da reativação da memória de medo ao contexto.
- Avaliar o efeito do ZIP administrado no córtex PL imediatamente após a reativação da memória de medo ao contexto.
- Avaliar o efeito do ZIP administrado no córtex PL 1 hora após a reativação da memória de medo ao contexto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos pesando 290-320 g provenientes do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em grupos de cinco animais por gaiola com acesso a comida e água *ad libitum*, e mantidos em ambiente com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e o ciclo claro/escuro de 12 horas ciclo (luzes acesas às 7:00 e apagadas às 19:00). Todos os experimentos foram realizados após a aprovação do protocolo experimental pelo Comitê de Ética para o cuidado e uso de animais laboratoriais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (autorização número 1011) e foram realizados de acordo com o Guia para o cuidado e uso de animais de laboratório (Conselho Nacional de Pesquisa, 2011).

4.2 DROGAS

O tamoxifeno (TMX; Sigma, EUA), um inibidor não seletivo da PKC e um modulador seletivo de receptores de estrógeno, foi dissolvido em solução salina contendo 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) e infundido na dose de 0,25 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}/\text{hemisfério}$. A solução salina contendo 20% de DMSO, foi usada como controle (TALEBI et al. 2010).

A queleritrina (QUE; Sigma, EUA), um inibidor não seletivo da PKC, foi dissolvida em solução salina contendo 5% de monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80) e foi infundida na dose de 3,0 $\text{nmol}/0,2 \mu\text{L}/\text{hemisfério}$. A solução salina contendo 5% de Tween 80 (Veículo) foi utilizada como controle (PASTALKOVA et al, 2006).

O peptídeo zeta inibitório (ZIP; Anaspec, EUA), um inibidor da PKM ζ foi dissolvido em PBS (Tampão fosfato salina) na dose de 10 $\text{nmol}/0,2 \mu\text{L}/\text{hemisfério}$. O Scrambled-ZIP (SCR-ZIP; Tocris, EUA) na dose de 10 $\text{nmol}/0,2 \mu\text{L}$, foi dissolvido em PBS, e utilizado como controle (SHI et al., 2011).

A seleção da dose de cada droga foi baseada em estudos publicados anteriormente. As drogas foram preparadas, fracionadas em microtubos e posteriormente armazenadas em freezer -20°C.

4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA O IMPLANTE DE CÂNULAS

Os ratos foram anestesiados com quetamina (75 mg/kg; Carlier, Brasil) e xilazina (15 mg/kg; Sespo, Brasil), associada à anestesia local (lidocaína a 3,0% com noradrenalina 1:50000; Dentsply, Brasil). Após anestesia, os animais foram colocados no aparelho estereotáxico (KOPF®, EUA). Duas cânulas-guia de aço inoxidável (comprimento: 11 mm; diâmetro externo: 0,6 mm) foram implantadas bilateralmente direcionadas ao córtex PL ou ao córtex CCA seguindo as coordenadas (AP =+11,8 mm interaural, ML=±0,6 da sutura central, DV=-1,8 do crânio) do Atlas de cérebro de rato de Paxinos & Watson (2009). As cânulas foram fixadas ao crânio com dois parafusos e resina acrílica de uso ortodôntico. Para evitar uma possível oclusão, um mandril de aço inoxidável foi introduzido dentro de cada cânula-guia. Imediatamente após a cirurgia, os animais receberam 0,4 mL/kg de ibuprofeno por via oral (20 mg/mL, Natulab, Brasil; RAYMUNDI, et al., 2020) e após dez dias de recuperação do procedimento cirúrgico os experimentos comportamentais foram iniciados.

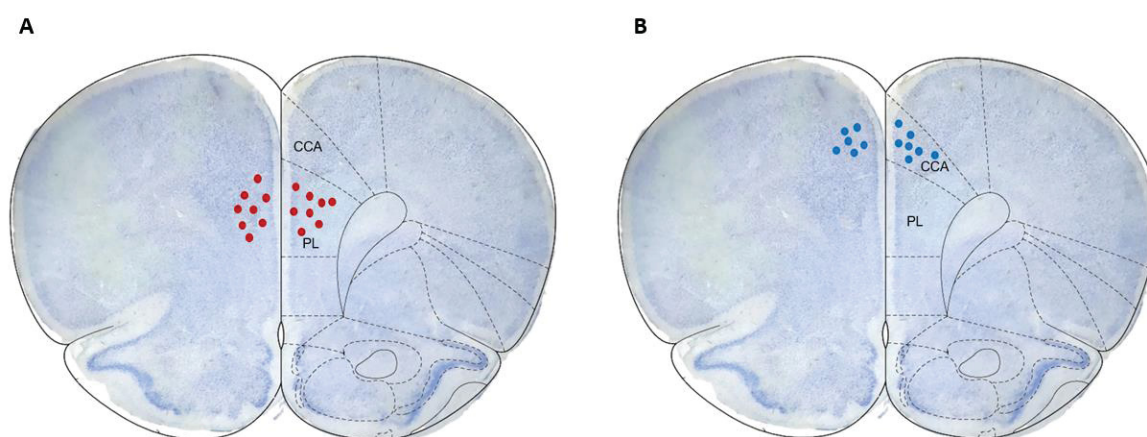
4.4 INFUSÃO BILATERAL DAS DROGAS

Em diferentes momentos após a reativação da memória, os animais receberam uma infusão bilateral com agulhas odontológicas introduzidas pelas cânulas-guia até que suas pontas estivessem 1,5 mm abaixo da extremidade da cânula quando as drogas foram infundidas no córtex PL, ou 1,2 mm quando as drogas foram infundidas no córtex CCA. Durante 1 min, 0,2 µL/hemisfério de veículo ou droga, foi infundido usando duas microseringas Hamilton® de 5,0 µL conectadas a uma bomba de infusão (Insight, Brasil) e um cateter de polietileno, foi interposto entre a extremidade superior das agulhas odontológicas e as seringas. Para monitorar o fluxo da infusão da droga foi observado o desloca-

mento de uma bolha de ar no interior do polietileno. As agulhas foram removidas 45 segundos após o término das infusões.

Após o finalizar os experimentos, os animais foram anestesiados usando 1,0 mL/kg de uma solução contendo xilazina (10 mg/mL, Carlier) e hidrato de cloral (2,3 mg/mL, Vetec) por via intraperitoneal (i.p.). O corante azul de metileno no volume de 0,2 μ L/hemisfério foi infundido através das cânulas-guia para a avaliação posterior dos locais de infusão. Logo depois, o cérebro foi removido e imerso em uma solução de 10% de formalina. Fatias de cérebro (50 μ m de espessura) foram obtidas em um vibrátomo (Leica®), e lâminas foram montadas, coradas com nissl e o local da infusão foi averiguado. Os animais foram incluídos na análise estatística quando a infusão foi confirmada nos dois hemisférios do córtex PL ou do CCA (Figura 7).

FIGURA 7 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL DE RATO



Fonte: Adaptado de DA SILVA et al., 2020.

Desenho esquemático do córtex pré-frontal medial do rato, destacando as sub-regiões do córtex pré-límbico (PL) e córtex cingulado anterior (CCA). (A) Posicionamentos representativos do local da infusão (em vermelho) no córtex PL. (B) Posicionamentos representativos do local da infusão (em azul) no CCA. Os animais foram incluídos na análise quando o tratamento foi infundido bilateralmente no córtex da PL ou no CCA.

4.5 APARATO

O condicionamento do medo ao contexto, foi realizado em uma caixa (Contexto A; 26x31,5x21 cm; Insight, Brasil), com paredes laterais em alumínio cinza, com a parede frontal e a tampa superior em acrílico transparente. O piso é feito de barras de aço inoxidável (3 mm de diâmetro e espaçamento de 0,9 mm entre as barras) conectadas a uma fonte geradora de choque (Insight, Brasil). Utilizou-se uma caixa neutra (Contexto B; 34x26x33 cm) com paredes de acrílico transparente e uma tampa preta para fornecer pistas contextuais diferentes do Contexto A. O contexto B foi usado para avaliar a generalização do medo ou como um contexto incapaz de induzir a reativação da memória.

4.6 PROCEDIMENTOS GERAIS

Todos os animais foram ambientados à sala experimental por pelo menos 30 minutos antes de cada sessão. As salas experimentais foram mantidas sob temperatura controlada (22 ± 2 °C) e com luminosidade de aproximadamente 80 lux.

O condicionamento do medo ao contexto consistiu nas seguintes sessões:

Sessão de familiarização: a sessão de familiarização foi realizada logo no primeiro dia dos testes comportamentais. Os animais foram colocados no contexto A por 3 minutos, onde exploraram livremente e depois retornaram às suas gaiolas (Figura 8 A).

Sessão de condicionamento: Após 24 horas da sessão de familiarização, os animais foram submetidos à sessão de condicionamento no Contexto A. Após os 30 segundos iniciais, os animais receberam três choques nas patas de 0,8 mA/3 segundos, com intervalo de 30 segundos entre os choques, o estímulo incondicionado (EI; Figura 8 B). Após o último choque, o animal permaneceu por mais 30 segundos na câmara de condicionamento e depois retornou para a gaiola moradia.

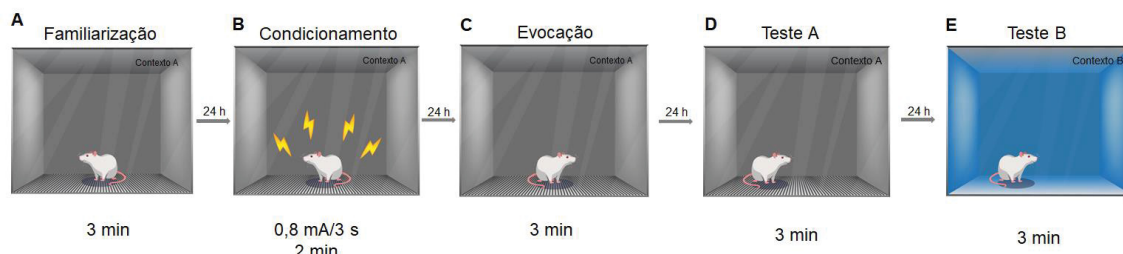
Sessão de evocação e reativação: Após 24 horas da sessão de condicionamento, foi realizada a sessão de evocação e reativação da memória de

medo. Os animais foram reexpostos ao Contexto A por 3 minutos sem a apresentação do EI. O tratamento com veículo ou as diferentes drogas foi feito bilateralmente no córtex PL ou no córtex CCA imediatamente, 1, 6, 9, 12 ou 18 horas após a sessão de reativação (Figura 8 C).

Teste A: Após 24 horas da sessão de evocação e reativação da memória de medo, os animais foram reexpostos ao Contexto A por 3 minutos (Teste A₁; Figura 8 D); e foram novamente expostos ao Contexto A (3 minutos) 7 e/ou 21 dias depois (Teste A₂ e Teste A₃, respectivamente).

Teste B: Em todos os experimentos, para avaliar a possível expressão do medo generalizado, 24 horas após os testes A₁, A₂, e/ou A₃ os animais foram expostos ao Contexto B não pareado e neutro (Teste B; Figura 8 E) por 3 minutos. Como nenhuma generalização do medo foi observada, esses dados foram omitidos. Além disso, a exposição ao Contexto B também foi usada para omitir a evocação da memória. As caixas foram limpas com uma solução a 10% de etanol após cada sessão.

FIGURA 8 – FIGURA ESQUEMÁTICA DAS SESSÕES EXPERIMENTAIS



(A) Sessão de familiarização: consiste na exposição dos animais ao Contexto A num período de 3 minutos sem a presença do estímulo incondicionado. (B) Sessão de condicionamento: a sessão de condicionamento foi realizada 24 horas após a familiarização e consistiu na exposição dos animais ao Contexto A, onde os animais receberam 3 choques (estímulo incondicionado, EI) na intensidade de 0,8 mA/3 s. Após 30 s do último EI os animais retornaram à caixa moradia. (C) Sessão de evocação e reativação: a sessão de evocação da memória foi realizada 24 horas após a sessão de condicionamento. A sessão de evocação é caracterizada por uma breve exposição de 3 min ao Contexto A, sem a apresentação do EI. (D) Teste A: o Teste A₁ foi realizado 24 horas após a sessão de evocação. Em todos os experimentos os animais foram reexpostos ao Teste A, denominada de Teste A₂. O Teste A consistiu na exposição dos animais no Contexto A, na ausência do EI, por 3 minutos para avaliação do comportamento de congelamento. Nos experimentos 6, 8 e 12, o Teste A ocorreu 24 horas após a exposição dos animais ao Contexto B. (E) Teste B: o Teste B correu 24 horas após o Teste A em todos os experimentos e consistiu na exposição dos animais ao Contexto B por 3 minutos. O comportamento de congelamento foi avaliado. Nos experimentos onde os animais tiveram a sessão de evocação omitida os animais foram expostos ao contexto B.

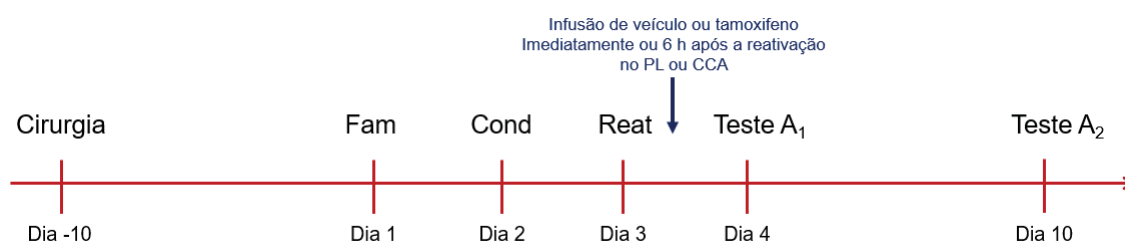
4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos de maneira semelhante aos estudos anteriores já realizados no laboratório (DA SILVA et al., 2016), e foram realizados entre 13 e 17 horas, para minimizar possíveis influências circadianas no aprendizado e no processamento da memória.

Para investigar se a inibição da PKC pelo tamoxifeno interfere com a reconsolidação de uma memória reativada, animais condicionados no medo ao contexto foram alocados aleatoriamente em grupos para receber uma infusão bilateral no córtex PL ou no CCA de veículo ou de tamoxifeno (0,25 µg) imediatamente após a sessão de reativação (Delineamento experimental 1; Figura 9; Resultado 1; Figura 13 A e Figura 13 C).

Para investigar se a inibição da PKC pelo tamoxifeno interfere com a persistência de uma memória reativada, animais condicionados no medo ao contexto foram alocados aleatoriamente em grupos para receber uma infusão bilateral no córtex PL ou no CCA de veículo ou de tamoxifeno (0,25 µg) 6 h após a sessão de reativação (Delineamento experimental 1; Figura 9; Resultado 1; Figura 13 B e Figura 13 D).

FIGURA 9 – FIGURA ESQUEMÁTICA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 1



Delineamento experimental dos procedimentos realizados para investigar se a inibição da PKC pelo tamoxifeno interfere com a reconsolidação ou na persistência de uma memória reativada. Os animais condicionados no medo ao contexto foram alocados aleatoriamente em grupos para receber uma infusão bilateral no córtex PL ou no CCA de veículo ou de tamoxifeno imediatamente ou 6 horas após a reativação. Fam, familiarização; Cond, condicionamento; Reat, reativação.

Para avaliar a expressão da Arc em diferentes tempos após a reativação da memória aversiva, os ratos foram condicionados, submetidos a sessão de reativação (Resultado 2; Figura 14 A) e posteriormente foram decapitados para avaliação da expressão da Arc imediatamente (0 hora), 90 min, 6, 9, 12 e 18

horas após a reativação (Delineamento experimental 2; Figura 10; Resultado 2; Figura 14 B).

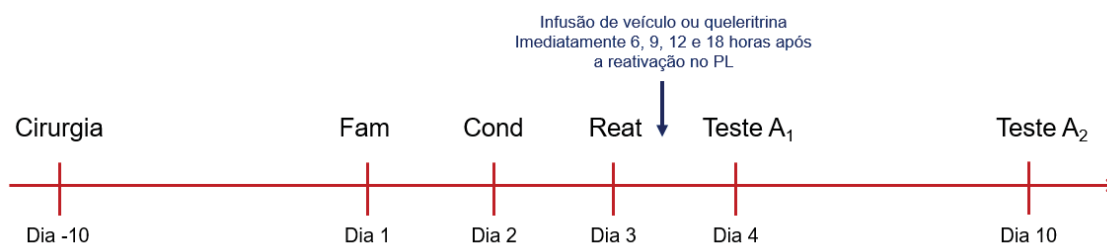
FIGURA 10 – FIGURA ESQUEMÁTICA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 2



Delineamento experimental dos procedimentos realizados para avaliar a expressão da Arc em diferentes tempos após a reativação da memória aversiva. Os ratos foram condicionados, submetidos a sessão de reativação e posteriormente foram decapitados para a dissecação dos encéfalos para avaliação da expressão da Arc. Fam, familiarização; Cond, condicionamento; Reat, reativação.

Para investigar se a inibição da PKC pela queleritrina interfere com a persistência de uma memória reativada, animais condicionados no medo ao contexto foram alocados aleatoriamente em grupos para receber uma infusão bilateral no córtex PL de veículo ou de queleritrina (3,0 nmol) 6, 9, 12 e 18 horas após a sessão de reativação (Delineamento experimental 3; Figura 11; Resultado 3; Figura 15 A-D).

FIGURA 11 – FIGURA ESQUEMÁTICA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 3



Delineamento experimental dos procedimentos realizados para investigar se a inibição da PKC pela queleritrina interfere com a persistência de uma memória reativada. Os animais condicionados no medo ao contexto foram alocados aleatoriamente em grupos para receber uma infusão bilateral no córtex PL de veículo ou de queleritrina 6, 9, 12 e 18 horas após a sessão de reativação. Fam, familiarização; Cond, condicionamento; Reat, reativação.

Posteriormente para investigar se o prejuízo na persistência da memória induzido pela queleritrina depende da reativação da memória, animais condicionados no medo ao contexto foram aleatoriamente alocados para receber uma infusão bilateral no córtex PL de veículo ou queleritrina (3,0 nmol) 6 horas após

a exposição ao contexto B por 3 min (Delineamento experimental 4; Figura 12; Resultado 4; Figura 16).

FIGURA 12 – FIGURA ESQUEMÁTICA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 4



Delineamento experimental dos procedimentos realizados para investigar se o prejuízo na persistência da memória induzido pela queleritina depende da reativação da memória. Os animais condicionados no medo ao contexto foram aleatoriamente alocados para receber uma infusão bilateral no córtex PL de veículo ou queleritina 6 horas após a exposição ao contexto B. Fam, familiarização; Cond, condicionamento; Não Reat, não reativação.

Para investigar a relevância da PKM ζ na persistência de uma memória reativada, animais condicionados no medo ao contexto foram alocados aleatoriamente em grupos que receberam uma infusão bilateral de Scr-ZIP (10 nmol) ou ZIP (10 nmol) no córtex PL 6 horas após a reexposição do contexto A (Resultado 5; Figura 17). Em seguida para investigar se o prejuízo na persistência da memória induzido pelo ZIP depende da reativação da memória, animais condicionados no medo ao contexto foram aleatoriamente alocados que receberam uma infusão bilateral no córtex PL de Scr-ZIP (10 nmol) ou ZIP (10 nmol) 6 horas após o contexto B por 3 min (Delineamento experimental 5; Figura 13; Resultado 6; Figura 18).

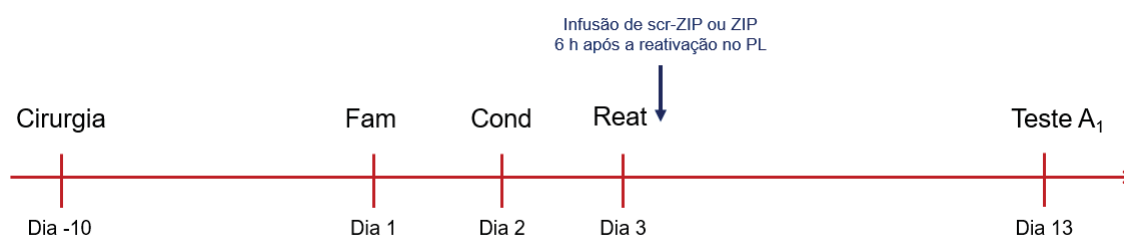
FIGURA 13 – FIGURA ESQUEMÁTICA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 5



Delineamento experimental dos procedimentos realizados para investigar a relevância da PKM ζ na persistência de uma memória reativada. Os animais condicionados no medo ao contexto foram alocados aleatoriamente em grupos para receber uma infusão bilateral de Scr-ZIP ou ZIP no córtex PL 6 horas após a reativação ou após a omissão da reativação. Fam, familiarização; Cond, condicionamento; Reat, reativação; Não Reat, não reativação.

Posteriormente para investigar se o prejuízo na persistência da memória induzido pelo ZIP depende da exposição do Teste A₁ no dia seguinte a reativação. Os animais condicionados no medo ao contexto, foram aleatoriamente alocados em grupos que receberam uma infusão bilateral de Scr-ZIP (10 nmol) ou ZIP (10 nmol) no córtex PL 6 horas após a reexposição do contexto A por 3 min e foram testados 10 dias a sessão de reativação (Delineamento experimental 6; Figura 14; Resultado 7; Figura 19).

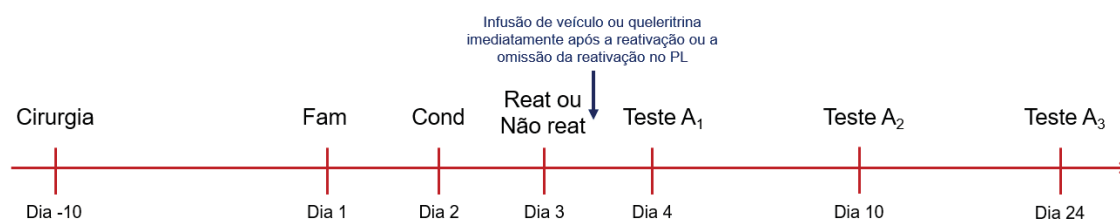
FIGURA 14 – FIGURA ESQUEMÁTICA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 6



Delineamento experimental dos procedimentos realizados para investigar se o prejuízo na persistência da memória induzido pelo ZIP depende da exposição do Teste A₁ no dia seguinte a reativação. Os animais condicionados no medo ao contexto, foram aleatoriamente alocados em grupos para receber uma infusão bilateral de Scr-ZIP ou ZIP no córtex PL 6 horas após a reativação e foram testados 10 dias mais tarde. Fam, familiarização; Cond, condicionamento; Reat, reativação. Fam, familiarização; Cond, condicionamento; Reat, reativação.

Para investigar se a inibição da PKC induzida pela queleritrina também interfere com a reconsolidação de uma memória reativada, animais condicionados no medo ao contexto foram alocados aleatoriamente em grupos que receberam uma infusão bilateral no córtex PL de veículo ou queleritrina (3,0 nmol), imediatamente após a reativação da memória (Resultado 8; Figura 20). Em seguida para investigar se possíveis comprometimentos na reconsolidação de memória induzida pela queleritrina necessitam da reativação da memória, imediatamente após a exposição ao contexto B (não reativado) os animais foram alocados aleatoriamente em grupos que receberam uma infusão bilateral no córtex PL de veículo ou queleritrina (3,0 nmol; Delineamento experimental 7; Figura 15; Resultado 9; Figura 21).

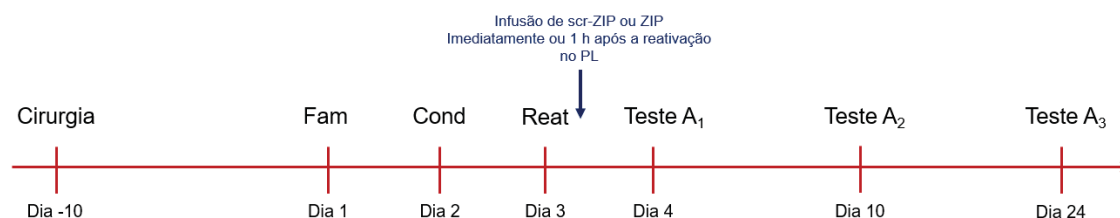
FIGURA 15 – FIGURA ESQUEMÁTICA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 7



Delineamento experimental dos procedimentos realizados para investigar se a inibição da PKC induzida pela queleritrina também interfere com a reconsolidação de uma memória reativada ou para investigar se possíveis comprometimentos na reconsolidação de memória induzida pela queleritrina necessitam da reativação da memória. Os animais foram alocados aleatoriamente em grupos para receber uma infusão bilateral no córtex PL de veículo ou queleritrina imediatamente após a reativação ou imediatamente após a omissão da reativação. Fam, familiarização; Cond, condicionamento; Reat, reativação; Não Reat, não reativação.

Para investigar se a inibição da PKM ζ induzida por ZIP também interfere na reconsolidação de uma memória reativada, os animais condicionados no medo ao contexto foram alocados aleatoriamente em grupos que receberam uma infusão bilateral no córtex PL de Scr-ZIP (10 nmol) ou ZIP (10 nmol) imediatamente ou 1 hora após a reativação da memória (Delineamento experimental 8; Figura 16; Resultado 10; Figura 22 A e 22 B respectivamente).

FIGURA 16 – FIGURA ESQUEMÁTICA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 8



Delineamento experimental dos procedimentos realizados para investigar se a inibição da PKM ζ induzida por ZIP interfere na reconsolidação de uma memória reativada, os animais condicionados no medo ao contexto foram alocados aleatoriamente em grupos para receber uma infusão bilateral no córtex PL de Scr-ZIP ou ZIP imediatamente ou 1 hora após a reativação da memória. Fam, familiarização; Cond, condicionamento; Reat, reativação.

O comportamento de congelamento, é definido como a ausência total de movimentos do corpo e da cabeça, exceto aqueles associados à respiração, foi usado como um índice da memória do medo (Blanchard and Blanchard, 1969). O comportamento dos animais foi registrado e o tempo de congelamento foi quantificado em segundos, e expresso como a porcentagem do tempo total da sessão.

4.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ARC POR WESTERN BLOTTING

As amostras de córtex PL coletadas foram homogeneizadas em tampão contendo Tris-HCl 10 mM pH 7,9; KCl 10 mM; MgCl 22 mM; EDTA 1 mM; NaF 1 mM; ortovanadato de sódio 2 mM; DTT 1 mM; aprotinina 10 µg/ml; leupeptina 10 µg/mL; fenilmetil-sulfonil fluoreto 1 mM e em seguida, mantidas em repouso por 15 minutos a 4°C. Os tecidos homogeneizados foram então centrifugados a 14.000 r.p.m, por 45min a 4°C, o sobrenadante (que corresponde ao extrato citosólico) foi descartado e o pellet foi lavado em PBS. Este foi novamente suspenso no mesmo tampão acima mencionado, acrescido de Triton X 100 a 1%, solubilizado em ultrassom, mantido em repouso por 15 minutos a 4°C e novamente centrifugado (14.000 r.p.m. por 45 min a 4°C). O sobrenadante foi coletado, e a concentração de proteínas das amostras foi dosada pelo método de *Bradford*. Aproximadamente 50 µg de proteína foram adicionadas ao tampão SDS-PAGE e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% a 100 V. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por eletroforese, utilizando-se corrente constante de 300 mA, durante 120 min. Após a transferência, a membrana foi incubada em leite Molico® desnatado (5%), durante 1 hora, a fim de bloquear sítios de ligação inespecífica. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* à 4°C com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-Arc (Santa Cruz Biotechnology Cat # sc-17839; diluição 1:500), lavadas em tampão apropriado e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a uma peroxidase (Santa Cruz Biotechnology Cat # sc - 516102; diluição 1:5000) durante 1 hora, a temperatura ambiente.

Posteriormente o *stripping* foi realizado para extrair os anticorpos anteriormente ligados e permitir a quantificação das proteínas α -tubulina com o objetivo de normalizar a quantidade de proteína carregada no gel. Para isso, as membranas foram incubadas com solução de *stripping* (β -mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris 62,5 mM pH 6,7) a 48 °C por 30 minutos com agitação a cada 10 minutos. Em seguida um novo bloqueio foi realizado e novamente as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal primário anti- α -tubulina (Santa Cruz Biotechnology Cat # sc-134237; diluição 1: 1.000), poste-

riormente as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo.

As bandas foram visualizadas por aumento da quimioluminescência, utilizando o sistema de detecção ECL Plus (AmershamBioBioscienceCorp.). A análise quantitativa foi realizada por densitometria, utilizando o software Scion Image (Scion Corporation, EUA). As intensidades foram normalizadas para valores correspondentes à expressão de α -tubulina e expressas com valor relativo à expressão basal (expressão do grupo Naive; RAYMUNDI et al., 2020).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra a priori determinado pela análise de potência, foi de oito animais por grupo ($\alpha=0,05$; $\beta=0,80$ e tamanho do efeito padronizado ou $d=1,0$ de Cohen). Os tamanhos dos grupos eram iguais por experimento, mas devido a perdas experimentais (por exemplo, quando o tratamento foi administrado fora da região do cérebro-alvo), em alguns casos, eles eram levemente desiguais.

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. As porcentagens de tempo de congelamento na sessão de não reativação (Contexto B), na sessão de reativação e nos testes A_1 , A_2 e A_3 foram submetidas a uma análise de variância de medidas repetidas (ANOVA) após assegurar a distribuição de normalidade dos dados. Os principais fatores avaliados foram o tratamento e a sessão (exposições ao contexto A e/ou contexto B). A interação entre tratamento e sessão também foi avaliada. O nível de significância estatística foi estabelecido em $P \leq 0,05$. O teste de Tukey foi utilizado para comparações de post-hoc quando os valores de F alcançaram significância estatística. Os dados da relação Arc/ α -tubulina do Western Blotting foram normalizados e depois foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via. O Statistica 10.0 (EUA) foi utilizado para análise estatística e o GraphPad Prism 8.3 (GraphPad Prism, EUA) foi utilizado para representação gráfica. O tamanho do efeito foi calculado usando a fórmula de Hedges 'g para refletir as diferenças médias entre dois grupos ($n \leq 20$ por grupo) que poderiam ter um tamanho não semelhante. Um $g \geq 0,8$ foi considerado um grande efeito (ELLIS, 2010).

5. RESULTADOS

5.1 – RESULTADO 1: O EFEITO DO TAMOXIFENO INFUNDIDO NO CÓRTEX PL E NO CCA IMEDIATAMENTE OU 6 HORAS APÓS A REATIVAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

Para avaliar os efeitos da inibição da PKC no córtex PL pelo tamoxifeno na reconsolidação da memória do medo ao contexto, os animais condicionados ao Contexto A foram alocados aleatoriamente em dois grupos e receberam veículo ou tamoxifeno (0,25 µg/0,2 µL/hemisfério) no córtex PL imediatamente (n=7-9) após reativação da memória. A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo das reexposições no contexto A [$F_{(2,28)}=21,83$; $P=0,0001$], do tratamento [$F_{(1,14)}=19,16$; $P=0,0006$] e da interação entre as reexposições e o tratamento no contexto A [$F_{(2,28)}=3,13$; $P=0,05$]. Como demonstrado na Figura 17 A, todos os grupos apresentaram tempo de congelamento semelhante durante a reativação da memória. Durante o Teste A₁ ($P=0,001$; tamanho efeito de Hedges $g=1,02$) e Teste A₂ ($P=0,006$; $g=0,99$), o teste post-hoc de Tukey indicou diferença significativa entre os grupos controle e tratados com tamoxifeno. O grupo tratado com tamoxifeno apresentou menos tempo de congelamento do que os controles e esse efeito durou pelo menos uma semana, sugerindo um prejuízo na reconsolidação de memória.

Em seguida avaliamos o efeito da inibição da PKC no córtex PL pelo tamoxifeno na persistência da memória do medo ao contexto. Os animais condicionados ao Contexto A foram alocados aleatoriamente em dois grupos e receberam veículo ou tamoxifeno (0,25 µg/0,2 µL/hemisfério) no córtex PL 6 horas após a reativação da memória. A ANOVA medidas repetidas demonstrou um efeito das reexposições do contexto A [$F_{(2,36)}=24,58$; $P=0,00001$], do tratamento [$F_{(1,18)}=21,40$; $P=0,0002$] e da interação entre as reexposições e o tratamento no contexto A [$F_{(2,36)}=10,62$; $P=0,0002$]. Como ilustrado na figura 17 B, não há diferenças entre os grupos durante a reativação da memória e o Teste A₁ ($P=0,11$; $g=0,35$). No entanto, durante o Teste A₂ ($P=0,0001$; $g=1,17$), o teste post-hoc de Tukey revelou uma diferença significativa entre os grupos controle e tratados com tamoxifeno, sugerindo um comprometimento na persistência da memória reativada.

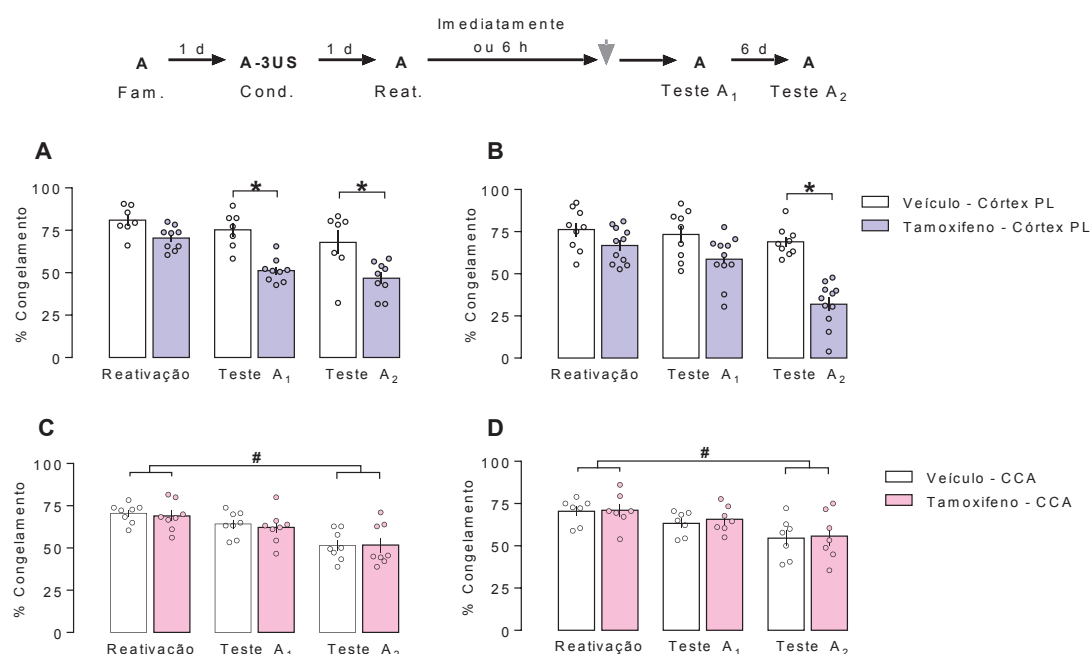
Posteriormente foi avaliado o efeito da inibição da PKC pelo tamoxifeno infundido no CCA na reconsolidação e na persistência da memória de medo. Portanto, foi avaliado o efeito do tamoxifeno infundido no CCA imediatamente após a reativação da memória. Os animais condicionados ao Contexto A foram alocados aleatoriamente em dois grupos e receberam veículo ou tamoxifeno (0,25 µg/0,2 µL/hemisfério) no CCA imediatamente (n = 8/grupo) após a reativação da memória. A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma diferença significativa das reexposições do contexto A [$F_{(2,28)}=36,30$; $P=0,00001$], no entanto, nenhuma diferença significativa do tratamento [$F_{(1,14)}=0,09$; $P=0,75$] ou a interação entre as reexposições e o tratamento no contexto A foi observada [$F_{(2,28)}=0,15$; $P=0,85$]. Como ilustrado na figura 17 C, o grupo tratado com tamoxifeno apresenta porcentagens semelhantes de tempo de congelamento ao longo das sessões, sugerindo nenhum efeito na reconsolidação da memória. Houve uma redução do tempo de congelamento no Teste A₂ quando comparado com a reativação da memória, sugerindo uma extinção da memória de medo nos dois grupos.

Em seguida foi avaliado o efeito do tamoxifeno infundido no CCA 6 horas após a reativação. Um grupo independente de animais condicionados foi alocado aleatoriamente em dois grupos e receberam veículo ou tamoxifeno (0,25 µg/0,2 µL/hemisfério) no ACC 6 horas (n = 7/grupo) após a reativação da memória. A ANOVA de medidas repetidas revelou uma diferença significativa das reexposições do contexto A [$F_{(2,24)}=16,92$; $P=0,00003$], no entanto, nenhuma diferença significativa do tratamento [$F_{(1,12)}=0,09$; $P=0,76$] ou a interação entre as reexposições e o tratamento no contexto A foi observada [$F_{(2,24)}=0,06$; $P=0,94$]. Como representado na figura 17 D, o grupo tratado com tamoxifeno apresenta porcentagens semelhantes de tempo de congelamento ao longo das sessões, sugerindo nenhum efeito na reconsolidação ou na persistência da memória. Houve uma redução do tempo de congelamento no Teste A₂ quando comparado com a recuperação de memória, sugerindo uma extinção da memória de medo nos dois grupos.

Em conjunto estes resultados sugerem que a atividade da PKC no córtex PL logo após a reativação participa do mecanismo de reconsolidação da memória, enquanto a administração do tamoxifeno 6 horas após a reativação sugere a participação da PKC no mecanismo de persistência de uma memória

aversiva. Além disso os resultados sugerem que a PKC no CCA não participa dos mecanismos de reconsolidação ou persistência da memória recente, pois quando o tamoxifeno foi infundido no CCA imediatamente ou 6 horas após a reativação da memória nenhuma diferença significativa foi observada durante a entre os grupos.

FIGURA 17 - EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PKC NO CÓRTEX PL E CCA PELO TAMOXIFENO IMEDIATAMENTE OU 6 HORAS APÓS A REATIVAÇÃO NA RECONSOLIDAÇÃO E NA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA



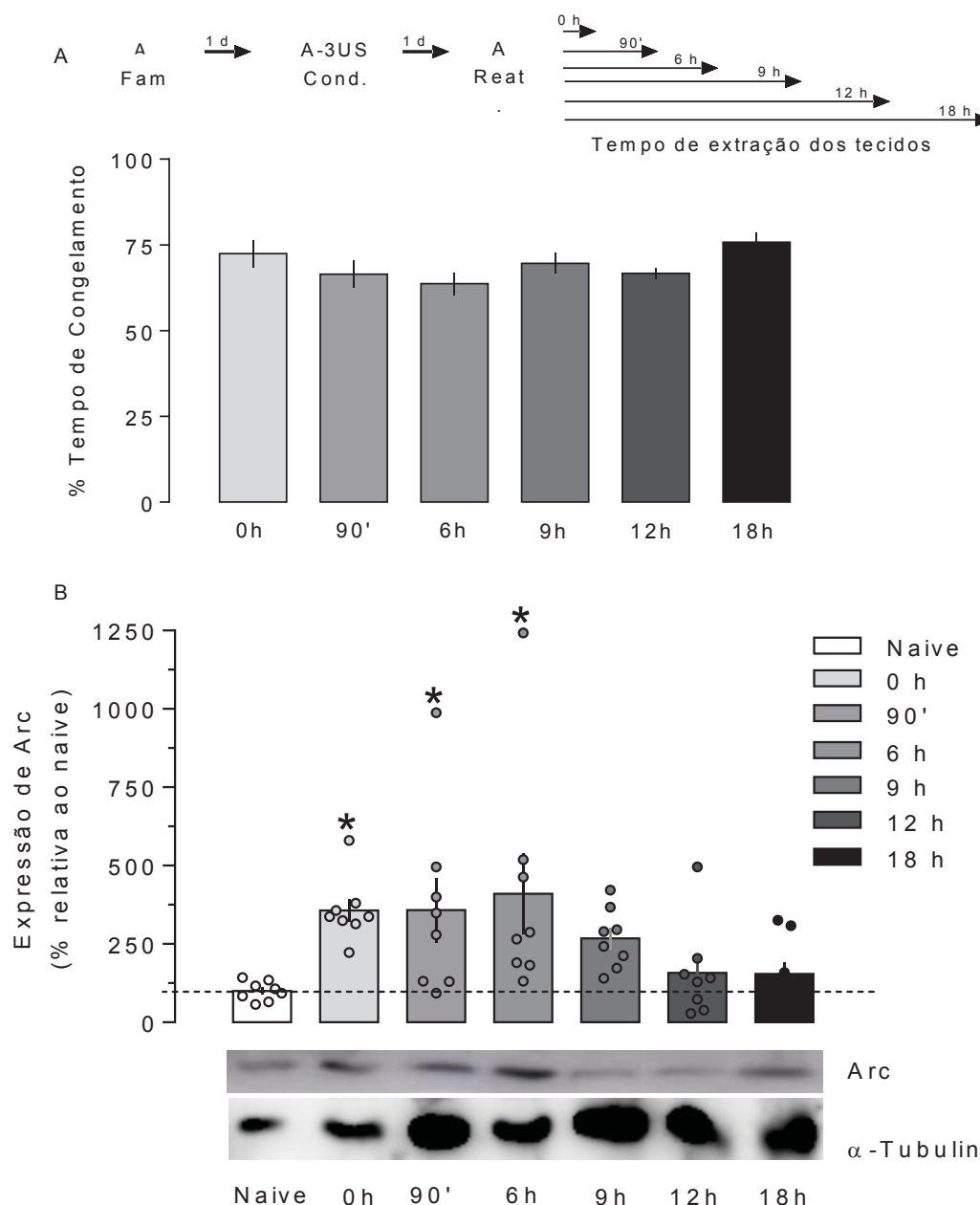
O esquema acima dos gráficos representa o desenho experimental geral utilizado. Os animais foram inicialmente familiarizados com o contexto A. Um dia depois, os animais foram condicionados com três choques nas patas. No dia seguinte, imediatamente ou 6 horas após a reativação da memória (reexposição do contexto A), grupos independentes de animais receberam uma infusão bilateral no córtex PL ou no CCA de veículo ou tamoxifeno (0,25 µg). Um e sete dias depois, os animais foram reexpostos ao contexto pareado (Testes A₁ e A₂) para avaliar os efeitos do tamoxifeno sobre a memória. (A) Os animais tratados com tamoxifeno no córtex PL imediatamente após a reativação, apresentaram menos tempo de congelamento do que os controles durante o Teste A₁ e Teste A₂, sugerindo um comprometimento da reconsolidação da memória. (B) Os animais tratados com tamoxifeno 6 horas no córtex PL após a reativação, apresentaram menos tempo de congelamento do que os controles durante o Teste A₂, sugerindo um comprometimento da persistência da memória. (C) Os animais tratados com tamoxifeno no CCA imediatamente após a reativação, não apresentaram diferenças tempo de congelamento quando comparados aos respectivos controles durante o Teste A₁ e Teste A₂. (D) Os animais tratados com tamoxifeno no CCA 6 horas após a reativação, não apresentaram diferenças tempo de congelamento quando comparados aos respectivos controles durante o Teste A₁ e Teste A₂, sugerindo que o CCA não participa dos mecanismos subjacentes a reativação na reconsolidação e na persistência da memória recente. Os valores são expressos como média ± E. P. M. (n por grupo: A=7-9; B=9-11; C=8/grupo; D=7/grupo). O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$) do respectivo grupo de controle, o hashtag indica uma diferença estatisticamente significativa (# $P < 0,05$) da sessão de reativação. (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey).

5.2 - RESULTADO 2: O AUMENTO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ARC NO CÓRTEX PL APÓS A REATIVAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

Um estudo de Maddox & Schafe, (2011) demonstrou a participação da proteína Arc no mecanismo de reconsolidação de uma memória de medo no hipocampo e na amígdala. Portanto, neste estudo foi investigado a expressão da Arc em diferentes pontos de tempo após a reativação da memória aversiva no córtex PL, região na qual o tamoxifeno produziu efeitos na reconsolidação e persistência da memória. Os ratos foram condicionados, submetidos a sessão de reativação (Figura 18 A) e foram decapitados para avaliação da expressão da Arc imediatamente (0 h), 90 min, 6, 9, 12 e 18 horas após a reativação. Nota-se que durante a sessão de reativação os animais não apresentaram diferenças significativas no comportamento de medo [$F_{(3,36)}=4,33$; $P=0,303$]. Um grupo adicional de animais naive foi usado para avaliar a expressão basal da proteína.

Os dados da relação Arc/ α -tubulina do Western Blotting foram normalizados e posteriormente foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk ($P=0,99$), e posteriormente os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. A ANOVA de uma via indicou um aumento da expressão de Arc [$F_{(6,49)}=4,67$; $P<0,0008$]. Como observado na Figura 18 B, houve um aumento na expressão da Arc imediatamente ($P<0,01$), 90 min ($P<0,05$), e 6 horas ($P<0,05$) após a reativação da memória de medo quando comparado com a expressão do grupo naive.

FIGURA 18 - O AUMENTO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ARC NO CÓRTEX PL APÓS A REATIVAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO



O esquema acima dos gráficos representa o desenho experimental geral utilizado. Os animais foram inicialmente familiarizados ao contexto A. Um dia depois, os animais foram condicionados com três choques nas patas. (A) No dia seguinte ao condicionamento, os animais tiveram a memória aversiva reativada. Apenas os ratos condicionados posteriormente foram decapitados para a dissecação do córtex PL para avaliação da expressão da Arc imediatamente (0 h), 90 min, 6, 9, 12 e 18 horas após a reativação. (B) Nos grupos que tiveram o córtex PL removido nos tempos de 0 h, 90 min e 6 h após a sessão de reativação ocorreu um aumento da expressão de Arc. Um grupo adicional de animais naive foi usado para avaliar a expressão basal da proteína. Os asteriscos indicam a significância ($*P < 0,05$) do grupo naive ($n = 7-8$ /grupo). A linha preta tracejada indica a média do grupo naive (100%).

5.3 – RESULTADO 3: EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PKC NO CÓRTEX PL PELA QUELERITRINA NA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA

Com base nos resultados anteriores, onde foi observado que interferência farmacológica no córtex PL após a janela de reconsolidação prejudicava especificamente a persistência da memória e no resultado da Arc, avaliamos o efeito da inibição da PKC pela queleritrina (inibidor seletivo da PKC) infundida no córtex PL nos tempos de 6, 9, 12 e 18 horas após a reativação da memória, com o intuito de avaliar se o efeito observado com o tamoxifeno foi em parte mediado pela ação na PKC (Figura 19).

No primeiro tempo avaliado (6 h) os animais condicionados ao Contexto A foram alocados aleatoriamente em dois grupos e receberam veículo ou queleritrina (3,0 nmol/0,2 µL/hemisfério) no córtex PL 6 horas após a reativação da memória. A ANOVA de medidas repetidas demonstrou efeitos significativos das reexposições do contexto A [$F_{(2,44)}=33,7$; $P<0,0001$], do tratamento [$F_{(1,22)}=8,77$; $P=0,007$] e da interação entre esses fatores [$F_{(2,44)}=22,0$; $P=0,00001$], para o tempo de congelamento. Como observado na figura 19 A, o teste post-hoc de Tukey revelou uma diferença significativa entre os grupos controle e queleritrina ($n=13$ e 11 , respectivamente) durante o teste A_2 ($P=0,0001$; $g=2,65$), mas não na sessão de reativação ($P=0,90$; $g=0,40$) ou no Teste A_1 ($P=0,95$; $g=0,34$), sugerindo um comprometimento específico da persistência da memória, sem afetar a reconsolidação.

Posteriormente, no segundo tempo avaliado (9 horas) os animais condicionados ao Contexto A foram alocados aleatoriamente em dois grupos e receberam veículo ou queleritrina (3,0 nmol/0,2 µL/hemisfério) no córtex PL 9 horas após a reativação da memória. A ANOVA de medidas repetidas indicou efeitos significativos das reexposições do contexto A [$F_{(2,36)}=25,1$; $P<0,0001$], do tratamento [$F_{(1,18)}=8,95$; $P=0,0078$] e da sua interação [$F_{(2,36)}=7,06$; $P=0,0026$]. Como ilustrado na figura 19 B, houve uma diferença significativa entre os grupos controle e queleritrina ($n=12$ e 8 , respectivamente) durante o Teste A_2 ($P=0,001$; $g=1,92$), mas não a sessão de reativação ($P=0,81$; $g=0,63$) ou Teste A_1 ($P=0,53$; $g=0,77$).

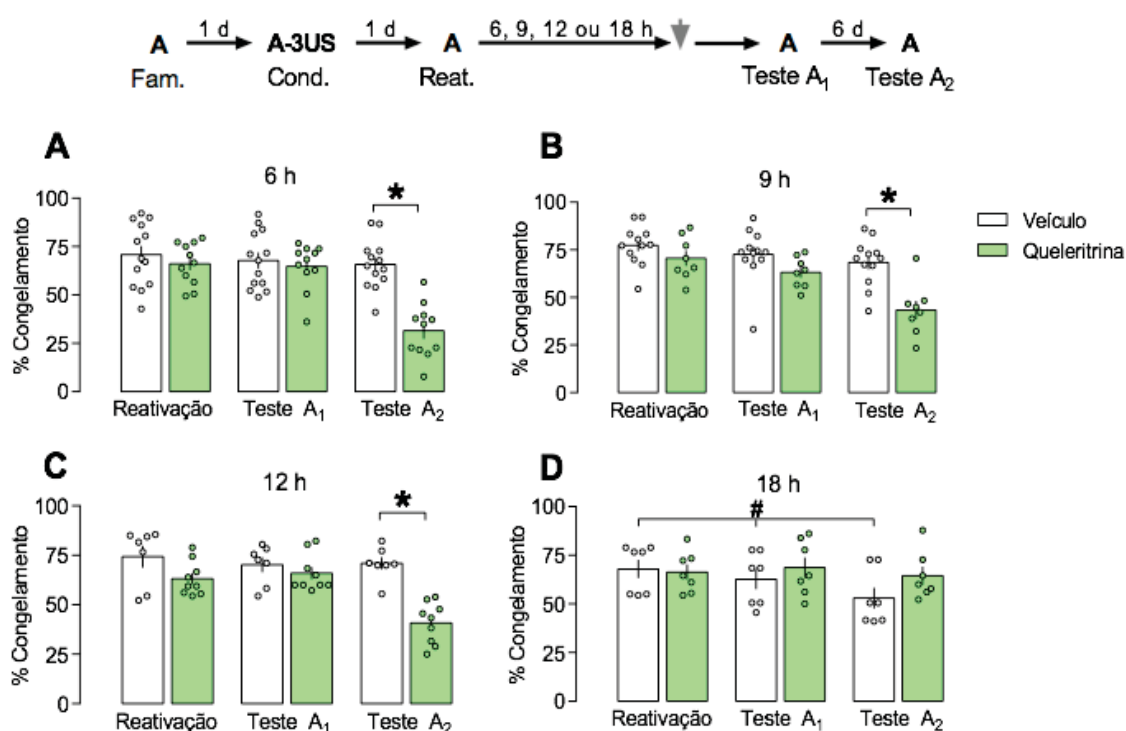
Em seguida, no terceiro tempo avaliado (12 horas) os animais condicionados ao Contexto A foram alocados aleatoriamente em dois grupos e recebeu

veículo ou queleritrina (3,0 nmol/0,2 µL/hemisfério) no córtex PL 12 horas após a reativação da memória. A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeitos significativos das reexposições do contexto A [$F_{(2,28)}=20,9$; $P<0,0001$], o tratamento [$F_{(1,14)}=11,3$; $P=0,0047$] e sua interação [$F_{(2,28)}=18,0$; $P<0,0001$]. Como representado na figura 19 C, houve uma diferença significativa entre os grupos controle e queleritrina ($n=7$ e 9 , respectivamente) durante o Teste A₂ ($P=0,0002$; $g=3,15$), mas não na sessão de reativação ($P=0,31$; $g=0,75$) ou no Teste A₁ ($P=0,96$; $g=0,43$).

Finalmente no quarto tempo avaliado (18 horas) os animais condicionados ao Contexto A foram alocados aleatoriamente em dois grupos e receberam veículo ou queleritrina (3,0 nmol/0,2 µL/hemisfério) no córtex PL 18 horas após a reativação da memória. A ANOVA de medidas repetidas demonstrou efeitos significativos das reexposições do contexto A [$F_{(2,24)}=9,43$; $P<0,0001$] e uma interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(2,24)}=5,00$; $P=0,02$], mas não o tratamento [$F_{(1,12)}=0,66$; $P=0,43$]. Como observado na figura 19 D, houve uma diferença significativa entre o Teste A₂ e a sessão de reativação nos animais tratados com o veículo ($P=0,03$; $g=1,12$; $n=7$), mas não com a queleritrina ($P=0,57$; $g=0,76$; $n=7$). Não houve diferenças significativas entre os grupos durante qualquer sessão realizada.

Em conjunto, estes resultados sugerem a participação da PKC presente no córtex PL nos tempos de 6, 9 e 12 horas após a reativação nos mecanismos de persistência da memória de medo contextual.

FIGURA 19 - EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PKC NO CÓRTEX PL PELA QUELERITRINA NA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA EM DIFERENTES PONTOS DE TEMPO APÓS A REATIVAÇÃO DA MEMÓRIA

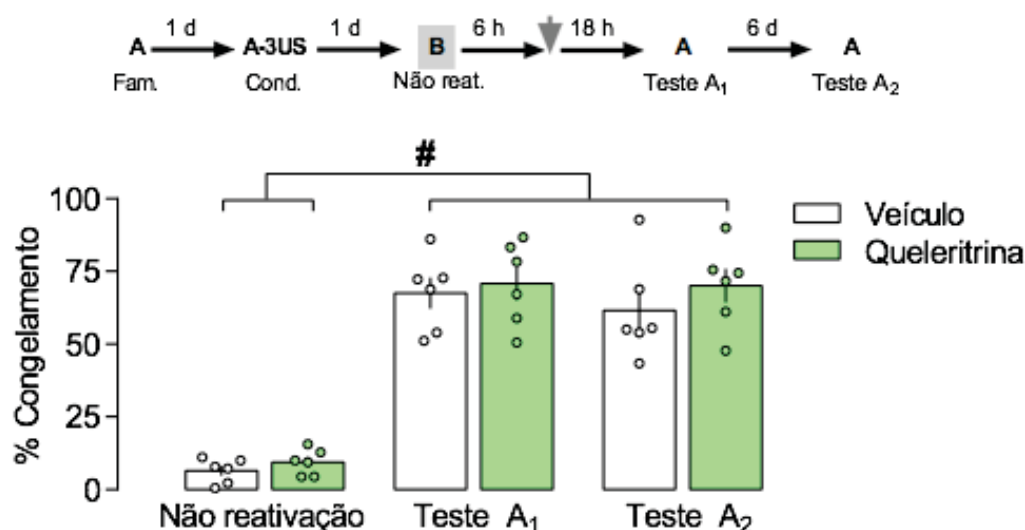


O esquema superior aos gráficos representa o desenho experimental geral utilizado. Os animais foram inicialmente familiarizados com o contexto A. Um dia depois, os animais foram condicionados com três choques. No dia seguinte, de 6 a 18 horas após a reativação da memória (reexposição do contexto A), grupos independentes de animais receberam uma infusão bilateral do córtex intra-PL de veículo (Veh) ou queleritrina (3,0 nmol). Um e sete dias depois, os animais foram reexpostos ao contexto emparelhado (testes A₁ e A₂) para avaliar os efeitos da queleritrina na memória. (A) Os efeitos da queleritrina na persistência da memória quando administrada 6 horas após a reativação. Animais tratados com queleritrina apresentaram menos tempo de congelamento do que os controles durante o teste A₂, sugerindo um comprometimento da persistência da memória. (B) Os efeitos da queleritrina na persistência da memória quando administrada 9 horas após a reativação. Os animais tratados com queleritrina apresentaram menos tempo de congelamento que os controles durante o teste A₂, sugerindo um comprometimento da persistência da memória. (C) Os efeitos da queleritrina na persistência da memória quando administrada 12 horas após a reativação. Os animais tratados com queleritrina apresentaram menos tempo de congelamento do que os controles durante o teste A₂, sugerindo um comprometimento da persistência da memória. (D) Os efeitos da queleritrina na persistência da memória quando administrada 18 horas após reativação. Os animais tratados com queleritrina apresentaram tempo de congelamento semelhante aos controles durante o Teste A₂, sugerindo não que neste tempo a droga não interfere na persistência da memória. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$) do respectivo grupo de controle, o hashtag indica uma diferença estatisticamente significativa (# $P < 0,05$) da sessão de reativação. (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey).

5.4 –RESULTADO 4: O PREJUÍZO DA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA PKC NO CÓRTEX PL REQUER REATIVAÇÃO PRÉVIA DA MEMÓRIA

Os prejuízos na persistência da memória induzidas pela queleritrina foram semelhantes quando esta droga foi administrada 6, 9 ou 12 horas após a sessão de reativação. Com base nisso, o primeiro momento (6 horas) foi selecionado para realizar o próximo experimento no qual a sessão de reativação da memória foi omitida (Figura 20) para investigar se a reativação é um pré-requisito para a observação do resultado acima mencionado. Portanto, os animais condicionados no medo ao contexto foram expostos a um contexto B neutro e 6 horas depois receberam veículo ou queleritrina ($n = 6/\text{grupo}$) intra córtex PL. A ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos significativos das reexposições do contexto A [$F_{(2,20)} = 167,48$; $P = 0,000001$], mas não indicou efeito do tratamento [$F_{(1,10)} = 0,75$; $P = 0,40$] ou da sua interação [$F_{(2,20)} = 0,34$; $P = 0,71$]. Como ilustrado na figura 16, ambos os grupos apresentaram valores mais altos de congelamento durante os testes A₁ e A₂ do que na sessão sem reativação ($P < 0,0001$), confirmando que esse comportamento condicionado é observado predominantemente quando os animais são reexpostos ao contexto de condicionamento. Além disso, não houve diferenças significativas entre os grupos durante nenhuma sessão realizada, indicando que a reativação da memória é essencial para os prejuízos induzidos pela queleritrina em sua persistência.

FIGURA 20 - O PREJUÍZO DA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA PKC NO CÓRTEX PL REQUER REATIVAÇÃO PRÉVIA DA MEMÓRIA



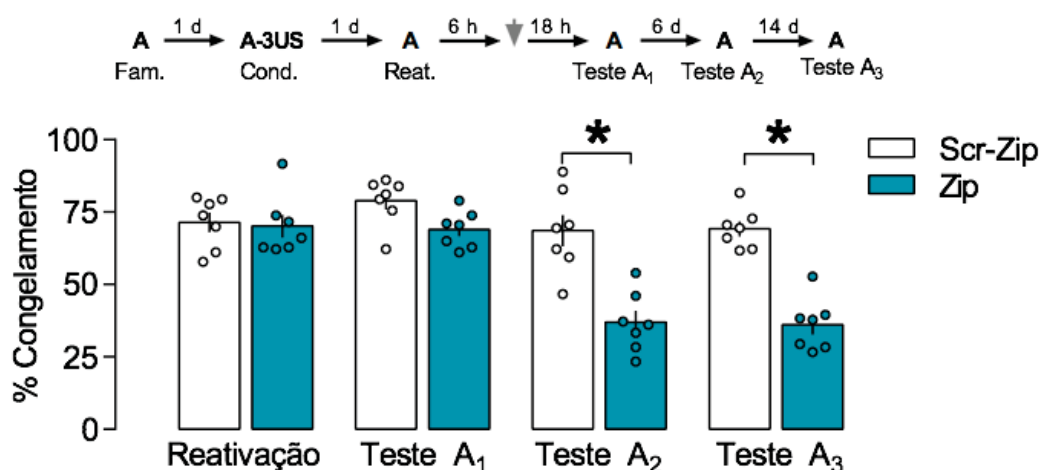
O esquema superior representa o desenho experimental geral utilizado. Os animais foram inicialmente familiarizados com o contexto A. Um dia depois os animais foram condicionados ao contexto com três choques nas patas. No dia seguinte, 6 horas após a omissão da reativação da memória (exposição ao contexto B neutro), os animais receberam uma infusão bilateral de córtex intra-PL de veículo ou queleritrina (3,0 nmol). Um e sete dias depois, os animais foram reexpostos ao contexto pareado (testes A₁ e A₂) para avaliar os efeitos da queleritrina na memória. Os animais tratados com queleritrina apresentaram tempo de congelamento semelhante aos controles durante o Teste A₂, sugerindo não haver alterações na persistência da memória. Os valores são expressos como média ± E. P. M (6 animais por grupo). O hashtag indica uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) dos testes A₁ e A₂ comparados à sessão de não reativação nos dois grupos (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey).

5.5 – RESULTADO 5: EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PKM ζ NO CÓRTEX PL PELO ZIP NA PERSISTÊNCIA DE UMA MEMÓRIA DE MEDO CONTEXTUAL REATIVADA

Com base nos experimentos anteriores, nos quais foram observados que a inibição da PKC no córtex PL 6 horas após reativação da memória de medo, interfere na persistência da memória, e em um estudo que avaliou superexpressão de PKM ζ no córtex PL tem demonstrado potencializar a persistência aversiva da memória (XUE et al., 2015), investigamos se a atividade de PKM ζ no córtex PL 6 horas após reativar uma memória de medo contextual está envolvida em sua persistência (Figura 21).

Os animais condicionados ao Contexto A foram alocados aleatoriamente em dois grupos e receberam veículo ou ZIP no córtex PL (10 nmol/0,2 μ L/hemisfério) no córtex PL 6 horas após a reativação da memória. A ANOVA de medidas repetidas demonstrou efeitos significativos das reexposições do contexto A [$F_{(3,36)}=31,4$; $P<0,0001$], do tratamento [$F_{(1,12)}=25,9$; $P=0,0003$] e da sua interação [$F_{(3,36)}=15,1$; $P=0,0001$]. Conforme representado na figura 17, houve diferenças significativas entre os grupos controle e ZIP ($n = 7$ em ambos os casos) durante o Teste A₂ ($P=0,0001$; $g=2,53$) e o Teste A₃ ($P=0,0001$; $g=4,11$), mas não durante a sessão de reativação ($P=0,99$; $g=0,13$) ou Teste A₁ ($P=0,54$; $g=1,35$). Em conjunto, os resultados associam a atividade PKM ζ do córtex PL 6 horas após reativar uma memória aversiva com sua persistência.

FIGURA 21 - EFEITOS DA INIBIÇÃO DE PKM ζ NO CÓRTEX PL POR ZIP NA PERSISTÊNCIA DE UMA MEMÓRIA DE MEDO CONTEXTUAL REATIVADA

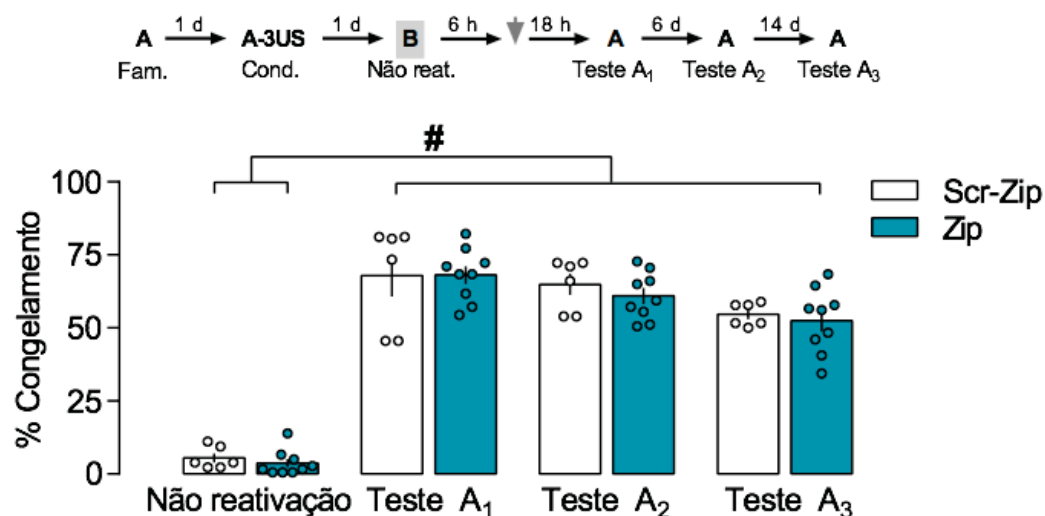


O esquema superior representa o desenho experimental geral utilizado. Os animais foram inicialmente familiarizados com o contexto A. Um dia depois, os animais foram condicionados com três choques. No dia seguinte, 6 horas após a reativação da memória (reexposição do contexto A), grupos independentes de animais receberam uma infusão bilateral no córtex intra-PL de ZIP (10 nmol) ou Scr-ZIP (10 nmol). Um, sete e vinte e um dias depois, os animais foram reexpostos ao contexto pareado (testes A₁ e A₂) para avaliar os efeitos do ZIP sobre a memória. Os animais tratados com ZIP apresentaram menos tempo de congelamento do que os controles durante o Teste A₂ e Teste A₃, sugerindo um comprometimento da persistência da memória. Os valores são expressos como média \pm E. P. M. (número de animais por grupo: 7). O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa (* $P<0,05$) do respectivo grupo de controle (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey).

5.6 – RESULTADO 6: O PREJUÍZO DA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA PKM ζ NO CÓRTEX PL REQUER REATIVAÇÃO PRÉVIA DA MEMÓRIA

Para investigar se a reativação da memória é um pré-requisito para o ZIP prejudicar o processo de persistência, no experimento seguinte, os animais foram expostos a um Contexto B neutro e não pareado (sessão sem reativação) e 6 horas depois receberam veículo ou ZIP no córtex PL (n= 6 a 9 respectivamente) (Fig.19). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos significativos das reexposições do contexto A [$F_{(3, 39)}=202$; $P=0,00001$], mas não mostrou diferença significativa do tratamento [$F_{(1, 13)}=0,33$; $P=0,57$] ou da interação [$F_{(3, 39)}=0,17$; $P=0,91$]. Como observado na figura 22, ambos os grupos apresentaram maior tempo de congelamento durante os testes A₁, A₂ e A₃ do que na sessão sem reativação ($P<0,0001$), confirmando que a expressão do medo é seletiva ao contexto de condicionamento. Além disso, não houve diferenças significativas entre os grupos durante nenhuma sessão realizada, indicando que a reativação da memória é necessária para as alterações induzidas pelo ZIP na persistência da memória.

FIGURA 22 - O PREJUÍZO DA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA PKM ζ NO CÓRTEX PL REQUER REATIVAÇÃO PRÉVIA DA MEMÓRIA



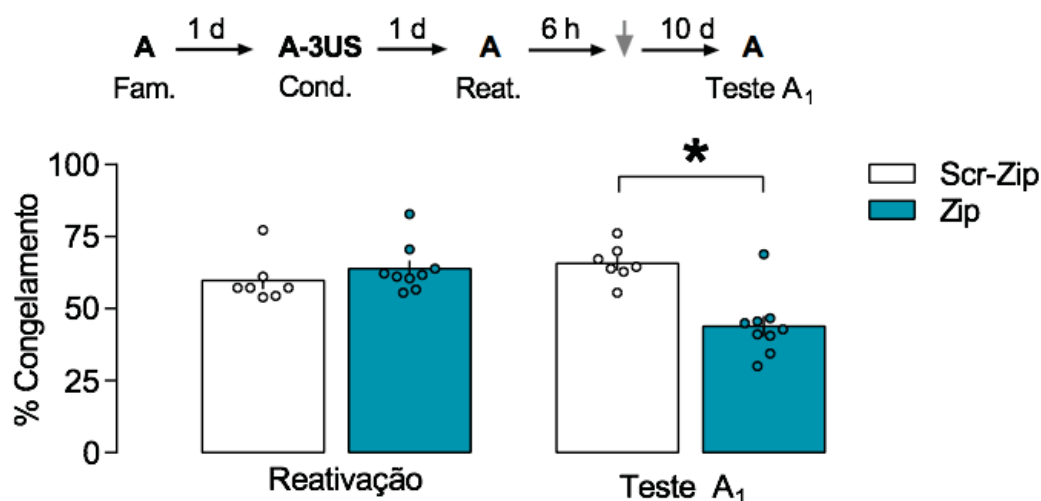
O esquema superior representa o desenho experimental geral utilizado. Os animais foram inicialmente familiarizados com o contexto A. Um dia depois os animais foram condicionados ao contexto com três choques nas patas. No dia seguinte, 6 horas após a omissão da reativação da memória (exposição ao contexto B neutro), os animais receberam uma infusão bilateral de córtex intra-PL de ZIP (10 nmol) ou Scr-ZIP (10 nmol). Um, sete e vinte e um dias depois, os animais foram reexpostos ao contexto pareado (testes A₁, A₂ e A₃) para avaliar os efeitos do ZIP na memória. Os animais tratados com ZIP apresentaram tempo de congelamento semelhante aos controles durante o Teste A₂ e Teste A₃, sugerindo não haver alterações na persistência da memória. Os valores são expressos como média ± E. P. M (número de animais por grupo: 6-9). A hashtag indica uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) dos testes A₁, A₂, e A₃ comparados à sessão de não reativação nos dois grupos (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey).

5.7 – RESULTADO 7: O PREJUÍZO DA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA PKM ζ NO CÓRTEX PL É INDEPENDENTE DO TEMPO DECORRIDO ENTRE A ADMINISTRAÇÃO DO ZIP E O TESTE A₁

Argumenta-se que a inibição da PKM ζ pode prejudicar temporariamente a expressão da memória, em vez de interferir permanentemente em sua persistência (Parsons & Davis, 2011). Para investigar se os efeitos induzidos pelo ZIP na persistência de uma memória reativada dependem do tempo decorrido entre o tratamento e o Teste A₁ (Figura 23), no experimento seguinte, os animais receberam o tratamento veículo ou ZIP no córtex PL 6 horas após a reativação da memória e o teste A₁ foi realizado após 10 dias (ao invés de 1 dia depois). A

ANOVA de medidas repetidas mostrou efeitos significativos das reexposições do contexto A [$F_{(1, 14)}=5,68$; $P<0,03$], do tratamento [$F_{(1, 14)}=7,40$; $P=0,01$] e da interação [$F_{(1, 14)}=19,41$; $P=0,0006$]. Como ilustrado na figura 19, houve uma diferença significativa entre os grupos controle e ZIP ($n= 7-9$ animais/grupo) durante o Teste A₁ ($P=0,01$; $g=2,37$), mas não a sessão de reativação ($P=0,78$; $g=0,50$). Esses resultados corroboram a ideia que a atividade da PKM ζ no córtex PL 6 horas após a reativação de uma memória de medo contextual esteja envolvida em sua persistência e indicam que a ação do ZIP é independente do tempo decorrido entre sua administração e o Teste A₁.

FIGURA 23 - O PREJUÍZO DA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA PKM ζ NO CÓRTEX PL É INDEPENDENTE DO TEMPO DECORRIDO ENTRE A ADMINISTRAÇÃO DE ZIP E O TESTE A₁

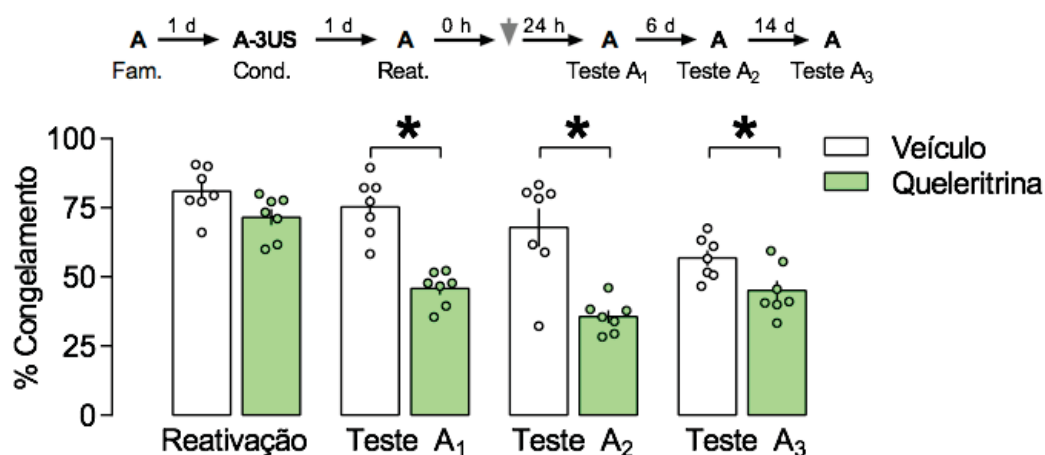


O esquema superior representa o desenho experimental geral utilizado. Os animais foram inicialmente familiarizados com o contexto A. Um dia depois os animais foram condicionados ao contexto com três choques nas patas. No dia seguinte, 6 horas após a reativação da memória (reexposição do contexto A), os animais receberam uma infusão bilateral de córtex intra-PL de ZIP ou Scr-ZIP. Dez dias depois, os animais foram reexpostos ao contexto pareado (Teste A₁) para avaliar os efeitos do ZIP na memória. Os animais tratados com ZIP apresentaram menos tempo de congelamento do que os controles durante o Teste A₁, sugerindo uma diminuição na persistência da memória. Os valores são expressos como média \pm S.E.M (número de animais por grupo: 7-9). O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa (* $P<0,05$) do respectivo grupo controle (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey).

5.8 – RESULTADO 8: EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PKC DO CÓRTEX PL PELA QUELERITRINA NA RECONSOLIDAÇÃO DE UMA MEMÓRIA DE MEDO CONTEXTUAL REATIVADA

Até o momento foi demonstrado o envolvimento da PKC e da PKM ζ na persistência da memória reativada. Então, investigamos se essas quinases contribuem da mesma forma para a reconsolidação da memória de medo ao contexto. Portanto, no experimento seguinte foi avaliado o efeito da inibição da PKC do córtex PL pela queleritrina na reconsolidação da memória (Figura 24). Os animais condicionados receberam veículo ou queleritrina no córtex PL imediatamente após a reativação da memória. A ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos significativos das reexposições do contexto A [$F_{(3,36)}=22,5$; $P<0,0001$], do tratamento [$F_{(1,12)}=40,8$; $P=0,0001$] e da interação [$F_{(3,36)}=5,68$; $P=0,0027$]. Como ilustrado na figura 24, houve diferenças significativas entre os grupos controle e queleritrina ($n = 7$ em ambos os grupos) durante o Teste A₁ ($P=0,0003$; $g=2,95$), Teste A₂ ($P=0,0001$; $g=4,30$) e Teste A₃ ($P=0,003$; $g=1,26$), mas não na sessão de reativação ($P=0,60$; $g=0,79$). Esses resultados indicam que a atividade da PKC do córtex PL imediatamente após a reativação de uma memória de medo contextual está envolvida em sua reconsolidação e o comprometimento da reconsolidação induzida pela droga foi duradouro de modo que até o 21º dia nenhuma recuperação espontânea foi observada.

FIGURA 24 - EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PKC DO CÓRTEX PL PELA QUELERITRINA NA RECONSOLIDAÇÃO DE UMA MEMÓRIA DE MEDO CONTEXTUAL REATIVADA



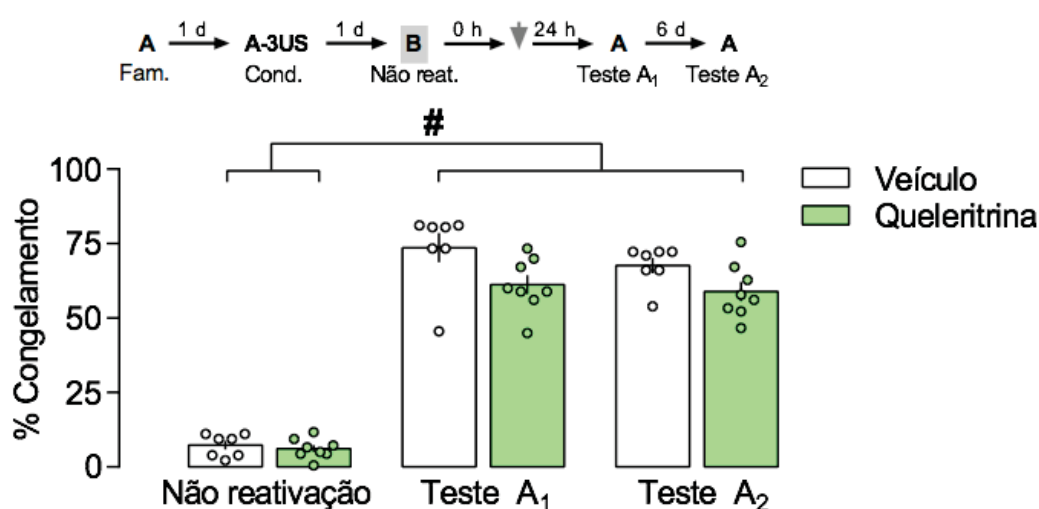
O esquema superior representa o desenho experimental geral utilizado. Os animais foram inicialmente familiarizados com o contexto A. Um dia depois, os animais foram condicionados com três choques nas patas. No dia seguinte, imediatamente após a reativação da memória (reexposição do contexto A), grupos independentes de animais receberam uma infusão bilateral no córtex intra-PL de veículo ou queleritrina (3,0 nmol). Um, sete e vinte e um dias depois, os animais foram reexpostos ao contexto pareado (testes A₁, A₂ e A₃) para avaliar os efeitos da queleritrina sobre a memória. Os animais tratados com queleritrina apresentaram menos tempo de congelamento do que os controles durante o Teste A₁, Teste A₂ e Teste A₃, sugerindo um comprometimento na reconsolidação da memória. Os valores são expressos como média \pm E. P. M. (número de animais por grupo: 7). O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$) do respectivo grupo de controle (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey).

5.9 – RESULTADO 9: O PREJUÍZO DA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA PKC NO CÓRTEX PL REQUER REATIVAÇÃO PRÉVIA DA MEMÓRIA

Para investigar se a reativação da memória é um pré-requisito para a queleritrina afetar o processo de reconsolidação, no próximo experimento a sessão de reativação foi omitida, e os animais foram expostos ao contexto B e, em seguida, tratados com veículo ou queleritrina no córtex PL (Figura 25; $n=6$ /grupo). A ANOVA de medidas repetidas demonstrou efeitos significativos das reexposições do contexto A [$F_{(2,26)}=379,7$; $P=0,0001$], mas não do tratamento [$F_{(1,13)}=5,71$; $P=0,06$] ou da interação [$F_{(2, 26)}=2,76$; $P=0,09$]. Como representado na figura 25, ambos os grupos apresentaram maior tempo de con-

gelamento durante os testes A₁ e A₂ do que na sessão sem reativação ($P<0,0001$), confirmando que a expressão de medo é seletiva ao contexto de condicionado. Além disso, não houve diferenças significativas entre os grupos durante qualquer sessão realizada, indicando que a reativação da memória também é necessária para alterações induzidas pela queleritrina na reconsolidação da memória.

FIGURA 25 - O PREJUÍZO DA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA PKC NO CÓRTEX PL REQUER REATIVAÇÃO PRÉVIA DA MEMÓRIA



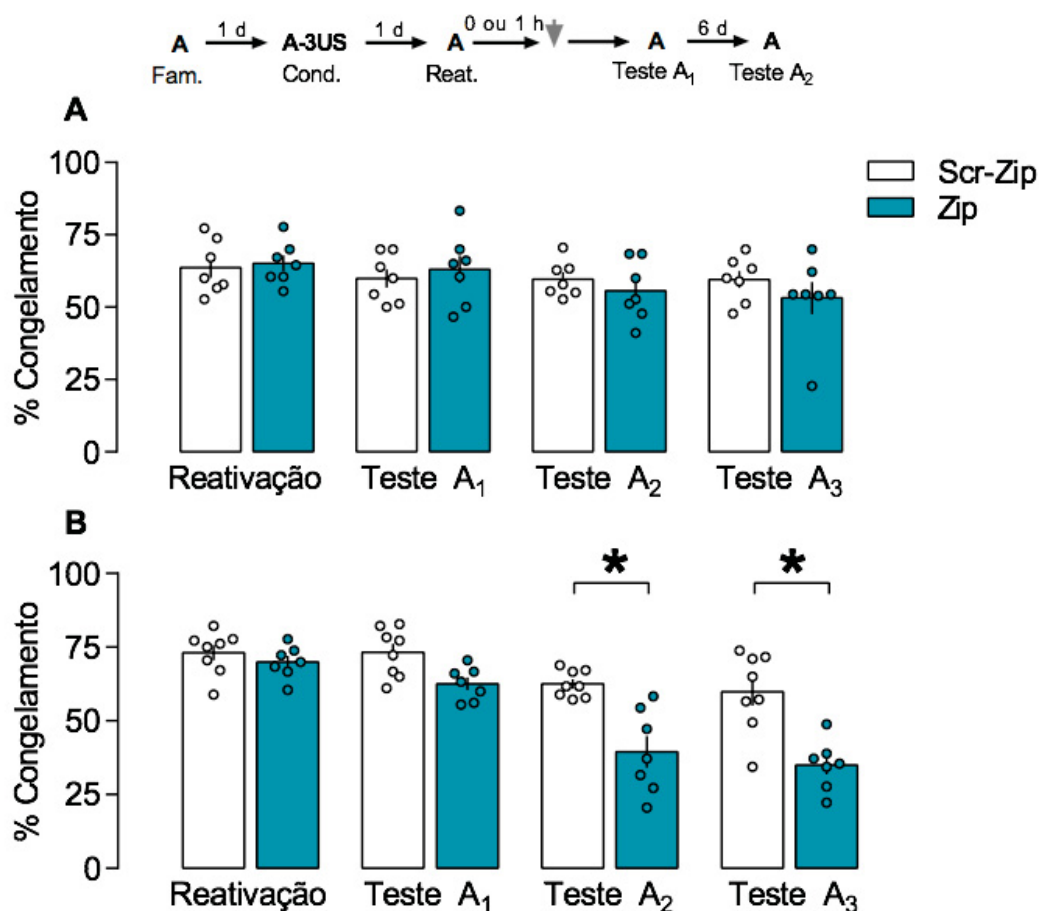
O esquema superior representa o desenho experimental geral utilizado. Os animais foram inicialmente familiarizados com o contexto A. Um dia depois os animais foram condicionados ao contexto com três choques nas patas. No dia seguinte, imediatamente após a omissão da reativação da memória (exposição ao contexto B neutro), os animais receberam uma infusão bilateral de córtex intra-PL de veículo ou queleritrina (3,0 nmol). Um e sete dias depois, os animais foram reexpostos ao contexto pareado (testes A₁ e A₂) para avaliar os efeitos da queleritrina na memória. Os animais tratados com queleritrina apresentaram tempo de congelamento semelhante aos controles durante o Teste A₁ e Teste A₂, sugerindo não haver alterações na reconsolidação da memória. Os valores são expressos como média ± E. P. M (6 animais por grupo). A hashtag indica uma diferença estatisticamente significativa ($\#P<0,05$) dos testes A₁ e A₂ comparados à sessão de não reativação nos dois grupos (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey).

5.10 – RESULTADO 10: EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PKM ζ DO CÓRTEX PL PELO ZIP NA RECONSOLIDAÇÃO DE UMA MEMÓRIA DE MEDO CONTEXTUAL REATIVADA

Para avaliar se a PKM ζ também participa da reconsolidação, no experimento seguinte foi avaliado o efeito do ZIP administrado no córtex PL imediatamente ou 1 hora após a sessão de reativação da memória. No primeiro momento selecionado (Figura 26 A), a ANOVA de medidas repetidas não demonstrou efeitos significativos das reexposições do contexto A [$F_{(3,36)}=4,33$; $P<0,303$], do tratamento [$F_{(1,12)}=0,109$; $P=0,7472$] e da sua interação [$F_{(3,36)}=1,62$; $P=0,19$]. Como observado na figura 26 A, não houve diferenças significativas entre os grupos controle e ZIP ($n=7$ em ambos os grupos) durante qualquer sessão realizada, sugerindo que a atividade de PKM ζ no córtex PL imediatamente após reativar uma memória de medo contextual não está envolvida nos mecanismos de reconsolidação e persistência da memória de medo.

Em seguida avaliamos o efeito do ZIP 1 hora após a reativação (Figura 26 B), a ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos significativos das reexposições do contexto A [$F_{(3,39)}=42,2$; $P<0,0001$], do tratamento [$F_{(1,13)}=20,2$; $P=0,0006$] e da interação [$F_{(3,39)}=7,82$; $P=0,0003$]. Como ilustrado na figura 26 B, houve diferenças significativas entre os grupos controle e ZIP ($n=8$ e 7 , respectivamente) durante o Teste A₂ ($P=0,0005$; $g=2,25$) e o Teste A₃ ($P=0,0002$; $g=2,19$), mas não na sessão de reativação ($P=0,99$; $g=0,48$) ou Teste A₁ ($P=0,35$; $g=1,48$). Em conjunto estes resultados sugerem que a atividade PKM ζ do córtex PL, 1 hora após a reativação de uma memória aversiva contribui para a persistência, mas não está envolvida com a reconsolidação da memória de medo.

FIGURA 26 - EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PKM ζ DO CÓRTEX PL IMEDIATAMENTE OU 1 HORA APÓS A REATIVAÇÃO POR ZIP NA RECONSOLIDAÇÃO DE UMA MEMÓRIA DE MEDO CONTEXTUAL



O esquema superior representa o desenho experimental geral utilizado. Os animais foram inicialmente familiarizados com o contexto A. Um dia depois, os animais foram condicionados com três choques. No dia seguinte, imediatamente após a reativação da memória (reexposição do contexto A), grupos independentes de animais receberam uma infusão bilateral no córtex intra-PL ZIP (10 nmol) ou Scr-ZIP (10 nmol) imediatamente ou 1 hora após a reativação. Um, sete e vinte e um dias depois, os animais foram reexpostos ao contexto pareado (testes A₁, A₂ e A₃) para avaliar os efeitos do ZIP sobre a memória. (A) Os animais tratados com o ZIP imediatamente após a reativação, apresentaram tempo de congelamento semelhante aos controles durante o Teste A₁, Teste A₂ e Teste A₃, sugerindo não haver alterações na reconsolidação nem na persistência da memória. (B) Os animais tratados com o ZIP 1 hora após a reativação, apresentaram menos tempo de congelamento do que os controles durante o Teste A₂ e Teste A₃, sugerindo um comprometimento da persistência da memória. Os valores são expressos como média \pm E. P. M. (número de animais por grupo: A=7; B= 7-8). O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($*P < 0,05$) do respectivo grupo de controle (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey).

6. DISCUSSÃO

Este estudo investigou o papel da PKC e da PKM ζ no córtex PL na reconsolidação e persistência de uma memória de medo contextual reativada em ratos.

Inicialmente demonstramos que a atividade da PKC é necessária para a reconsolidação e para a persistência de uma memória reativada. O resultado 1 demonstrou que a inibição da PKC no córtex PL pelo tamoxifeno imediatamente após a reativação da memória de medo, prejudicou a reconsolidação da memória aversiva. Em seguida foi mostrado que a inibição da PKC pelo tamoxifeno 6 horas após a reativação da memória de medo, prejudicou especificamente a persistência da memória de medo. Quando o tamoxifeno foi infundido no CCA imediatamente e 6 horas após a reativação, não foi observado nenhum comprometimento nos mecanismos de reconsolidação e da persistência de uma memória.

Posteriormente foi avaliada a expressão da proteína Arc (resultado 2) onde foi demonstrado um aumento da expressão da Arc imediatamente, 90 minutos e 6 horas após a reativação da memória. Nos demais tempo avaliados (9, 12 e 18 horas), foi observado que a expressão da Arc retornou a sua concentração basal. Com base nos achados encontrados nos resultados 1 e 2, investigamos se a atividade da PKC e da PKM ζ seria necessária para a persistência de uma memória reativada.

No resultado 3 demonstramos que a inibição da PKC pela queleritrina 6, 9 e 12 horas após a reativação da memória de medo, prejudicou especificamente a persistência da memória de medo reativada. No resultado 4, foi mostrado que os efeitos da inibição da PKC sobre a persistência da memória de medo, requerem a reativação prévia da memória. No resultado 5, foi demonstrado que a inibição da PKM ζ pelo ZIP 6 horas após a reativação da memória de medo, prejudicou especificamente a persistência da memória de medo reativada. Os efeitos da inibição da PKM ζ sobre a persistência da memória de medo requerem a reativação prévia da memória (resultado 6), e são independentes do teste inicial 1 dia após a infusão do ZIP (resultado 7).

Em seguida demonstramos que a atividade de PKC está envolvida na reconsolidação de uma memória reativada. Ao inibir a PKC pela queleritrina imediatamente após a reativação da memória de medo, prejudica a reconsolidação da memória de medo reativada (resultado 8). No resultado 9, foi observado que os efeitos da inibição da PKC pela queleritrina sobre a reconsolidação da memória de medo, requerem a reativação prévia da memória. A PKM ζ , não participa dos mecanismos envolvidos na reconsolidação de uma memória reativada; porém a atividade de PKM ζ durante a janela de tempo de reconsolidação é importante para a persistência da memória (resultado 10). Esses achados indicam que a PKC e a PKM ζ do córtex PL têm um envolvimento diferenciado nos processos avaliados.

6.1 – O EFEITO DO TAMOXIFENO INFUNDIDO NO CÓRTEX PL IMEDIATAMENTE OU 6 HORAS APÓS A REATIVAÇÃO DA MEMÓRIA RECENTE DE MEDO

Os ratos que receberam tamoxifeno no córtex PL imediatamente após a reativação da memória apresentaram menor tempo de congelamento do que os controles no dia seguinte, sugerindo um prejuízo na reconsolidação da memória de medo. Esse resultado está de acordo com estudos que relatam a participação dessa área na reconsolidação de memórias recentes de medo. Nesses trabalhos a inibição da mTOR no córtex PL (LEVIN et al., 2017), o bloqueio dos receptores α -1 adrenérgicos pelo antagonista prazosina (DO MONTE et al., 2013), do receptor canabinoide CB1 pelo canabidiol (STERN et al., 2015) prejudicaram a reconsolidação da memória de medo. Além disso, inativando o córtex PL com muscimol, o prejuízo da reconsolidação foi observado (STERN et al., 2014). É importante ressaltar que o efeito tamoxifeno durou pelo menos uma semana, sugerindo nenhuma recuperação espontânea da memória de medo, este resultado está de acordo com demais estudos que mostram ausência de recuperação espontânea da memória do medo uma semana após o prejuízo da reconsolidação da memória, além disso este dado confirma que a interferência farmacológica prejudicou a reconsolidação da memória e não facilitou.

tou a sua extinção, que também seria uma possibilidade (STERN et al., 2012; DUVARCI & NADER, 2004; BUSTOS et al., 2006).

A infusão de tamoxifeno no córtex PL 6 horas após a reativação da memória não alterou o comportamento de congelamento quando os animais foram submetidos ao Teste A₁ realizado 24 horas mais tarde, confirmando resultados de estudos anteriores que mostram que, neste momento, não são observadas interferências na reconsolidação da memória (STERN et al., 2012; NADER et al., 2000; PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997). No entanto, quando esses animais foram testados novamente sete dias depois, foi observada uma redução no comportamento de congelamento, sugerindo um efeito prejudicial na persistência da memória. Este resultado está de acordo com um estudo semelhante onde foi observado que a administração sistêmica do tamoxifeno 6 horas após a reativação prejudicou especificamente a persistência da memória (DA SILVA et al., 2016). Além disso outro estudo demonstrou que a inibição da síntese de proteínas 9,5 h após a reativação na amígdala basolateral prejudicou a persistência da memória de medo (NAKAYAMA et al., 2013). Em conjunto, esses resultados fornecem evidências que o córtex PL é recrutado para reconsolidação da memória de medo e para a persistência da memória de medo reativada.

Estudos sugerem que a reconsolidação das memórias recentes é menos dependente de algumas regiões corticais, como por exemplo o CCA (FRANKLAND et al., 2006; FRANKLAND & BONTEMPI, 2004). Portanto, foi avaliado o efeito do tamoxifeno infundido no CCA imediatamente ou 6 horas após a reativação da memória recente. A infusão do tamoxifeno no CCA imediatamente após a reativação da memória não alterou o comportamento de congelamento quando comparado aos controles 1 ou 7 dias depois, sugerindo não haver comprometimento da reconsolidação e da persistência da memória. Esse resultado está de acordo com os trabalhos que revelam que a infusão de anisomicina no CCA de camundongos após a reativação de uma memória de medo recente não alterou o comportamento de congelamento (FRANKLAND et al., 2006). No entanto, nosso resultado contrasta com dados que demonstram que a anisomicina administrada no CCA de rato imediatamente após a reativação de uma memória de medo recente prejudicou a reconsolidação de memória (EINARSSON & NADER, 2012). A intensidade do treinamento do condicionamento ou estresse prévio tem sido sugerida como condição que limita a deses-

tabilização e reconsolidação da memória (ESPEJO et al., 2016), no entanto, é improvável que esse fator explique os diferentes resultados observados, uma vez que adotamos um condicionamento de medo mais fraco que o protocolo que Einarsson & Nader, (2012) utilizaram. Outra diferença é a droga utilizada, uma vez que a anisomicina bloqueia a síntese proteica, enquanto o tamoxifeno interfere na sinalização mediada pelo estrogênio e inibe a PKC (HORGAN et al., 1986; O'BRIAN et al., 1990). Webb et al., (2017) mostraram através da avaliação de marcadores epigenéticos a contribuição do hipocampo para a reconsolidação da memória recente, é maior do que a das áreas corticais como o CCA (WEBB et al., 2017). Em conjuntos os resultados reforçam resultados anteriores que sugerem que o CCA não está envolvido nos mecanismos de reconsolidação da memória de medo recente e sugere que essa área também não seja recrutada para persistência de memórias de medo recentes reativadas.

O principal mecanismo de ação do tamoxifeno é a modulação dos receptores estrogênicos além de ser um inibidor da PKC. Os estrógenos têm sido implicados há muito tempo na influência dos processos cognitivos, mas os mecanismos moleculares subjacentes a esses efeitos e os papéis dos receptores de estrogênio alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$) permanecem incertos (FOY et al., 2008; LIU et al., 2008). Os receptores de estrogênio α e β são expressos em todo o cérebro de roedores (SHUGHRUE et al., 1997). Ambos são expressos no hipocampo porém o receptor de estrogênio β parece ter uma densidade maior no hipocampo nas regiões CA3, CA1, giro denteado, e são encontrados nos axônios e nas espículas dendríticas (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; MITRA et al., 2003; HERRICK et al., 2006; MILNER et al., 2005; SPENCER-SEGAL et al., 2012). Além disso Almey et al., (2014) demonstraram a presença dos receptores de estrogênio α e β no CPFm.

Entre os efeitos colaterais associados ao tamoxifeno incluem-se o comprometimento cognitivo (BOELE et al., 2015). No entanto, os aspectos e mecanismos específicos subjacentes a essas deficiências ainda precisam ser caracterizados. Um estudo observou que o tamoxifeno e a interação com os receptores de estrogênio na formação da memória da esQUIVA inibitória em fêmeas. Ao administrar o tamoxifeno (1 mg/kg) imediatamente após o treino observou-se um prejuízo da consolidação da memória quando os animais foram testados 24

horas mais tarde, porém quando trataram um grupo independente 3 horas após o treino, não observaram nenhum comprometimento do comportamento dos animais quando testados 24 horas mais tarde. Além disso, quando foi administrado um agonista de receptor de estrogênio α e um agonista de receptor de estrogênio β 30 minutos antes do treino, o prejuízo da memória de medo não foi observado. (LICHTENFELS et al., 2017). Como não podemos excluir a participação desses receptores no efeito do tamoxifeno, nos experimentos seguintes nós decidimos utilizar uma droga seletiva para PKC, a queletrina.

6.2 O AUMENTO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ARC NO CÓRTEX PL APÓS A REATIVAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

Nossos resultados demonstram que a expressão da Arc está aumentada significativamente durante a janela de reconsolidação, como pode-se observar na figura 14 B.

A Arc desempenha um papel fundamental nos mecanismos celulares subjacentes à plasticidade sináptica e da memória de longo prazo (LINK et al., 1995 ; BRAMHAM et al., 2010 ; SHEPHERD & BEAR, 2011). Um estudo observou a expressão da Arc imediatamente e 12 horas após o aprendizado associativo e foi relatado que a expressão da Arc aumenta não apenas durante a fase inicial da LTP, mas também 12 horas após o condicionamento do medo ao contexto no hipocampo dorsal (NAKAYAMA et al., 2015).

Nossos resultados mostram que a expressão da Arc está aumentada 6 h após a reativação. Este resultado concorda com estudos que relatam a expressão tardia de Arc após experimentos comportamentais envolvendo o paradigma da memória espacial (RAMÍREZ-AMAYA et al., 2013, JUNG & MCNAUGHTON, 1993 ; SOULÉ et al., 2008).

É provável que cascatas moleculares intracelulares tardias estejam envolvidas na expressão tardia da Arc. Estudos anteriores indicam que além da atividade neuronal, o BDNF tardio pode desencadear a expressão de Arc (LINK et al., 1995 ; LYFORD et al., 1995 ; YIN et al., 2002). Supostamente, cascatas moleculares que são iniciadas pelo aprendizado e provavelmente levam à expressão tardia do BDNF que desencadeia a expressão de Arc (KOKAIA et al.,

1993; ZAKHARENKO et al., 2003). Sugere-se que a expressão precoce da Arc, contribui para a formação da memória enquanto a expressão tardia contribui para a persistência da memória (NAKAYAMA et al., 2015).

Estudos evidenciaram que o BDNF tem expressão induzida no hipocampo e na amígdala de 8 a 12 h após o condicionamento ao contexto, a tarefas da esquivas inibitória e do condicionamento de aversão ao sabor (BEKINSCHTEIN et al., 2007; OU et al., 2010; MA et al., 2011). Já foi demonstrado que a inibição do BDNF não afeta a expressão precoce Arc (CHEN et al., 2012), e que a aplicação de BDNF em cultura de neurônios foi capaz de induzir a expressão da Arc (YIN et al., 2002).

Portanto, o aumento da expressão de Arc observado no córtex PL poderia ser desencadeado pela ação do BDNF? Um estudo destacou o aumento do mRNA de BDNF no córtex insular (CI) 2 horas após a reativação da memória de condicionamento a aversão ao sabor, e atingiu o pico de expressão 6 horas após. Neste mesmo estudo foi ressaltado que os níveis da proteína BDNF aumentou significativamente 4 horas após a reativação, atingiu o pico às 8 horas e retornou à expressão basal 12 horas após a reativação (WANG et al., 2012). Além disso, há uma hipótese que o BDNF pode regular a translocação da proteína PKM ζ para um sítio sináptico estimulado (SAJIKUMAR et al., 2005). Sendo assim, o BDNF pode facilitar a translocação de PKM ζ do citoplasma para locais sinápticos especificamente, portanto, quando a síntese de proteínas é inibida, ocorre uma escassez local da PKM ζ , podendo levar à necessidade de translocação da PKM ζ e o BDNF pode facilitar esse processo (SAJIKUMAR et al., 2005).

6.3 A ATIVIDADE DE PKC E PKM ζ É NECESSÁRIA PARA A PERSISTÊNCIA DE UMA MEMÓRIA REATIVADA

Como já relatado, a reconsolidação possui uma janela temporal que tem uma duração aproximada de 6 horas após a reativação da memória. Os resultados indicaram que inibição da PKC induzida pelo tamoxifeno e pela queleritina 6 horas após a reativação da memória não teve efeitos no tempo de congelamento quando os animais foram testados um dia depois (Teste A₁). Esse resultado corrobora com evidências anteriores que demonstram que várias in-

tervenções experimentais realizadas neste momento não são mais capazes de interferir na reconsolidação da memória (PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997; NADER et al., 2000; STERN, et al., 2012). Porém quando os animais foram novamente testados após sete dias (Teste A₂), houve uma diferença entre os grupos, sugerindo que a atividade da PKC no córtex PL é necessária para a persistência da memória aversiva reativada.

Nota-se que resultados semelhantes foram observados quando a inibição da PKC foi realizada no tempo de 9 e 12 horas após a reativação, onde pode-se observar que o percentual do tempo de congelamento é reduzido 7 dias após o tratamento farmacológico, mas não 24 horas mais tarde. Desse modo, observamos um alinhamento com outros relatos que relatam que após a infusão de anisomicina, um inibidor da síntese de proteínas, na amígdala basolateral, houve um prejuízo da memória espacial dos animais após 7 dias mais tarde, mas não quando os animais foram testados 2 dias após a reativação da memória. Além disso, este estudo avaliou a administração da anisomicina em diferentes momentos. A administração da anisomicina 5 e 24 horas após a reativação da memória não mostrou diferenças significativas entre o grupo tratado e o grupo controle (NAKAYAMA, et al., 2013). Posteriormente, um estudo evidenciou que ao inibir a via da ERK no hipocampo dorsal 3 horas após a recuperação da memória, houve prejuízo da memória dos animais, quando foram testados 7 dias mais tarde, sem afetar a reconsolidação (KRAWCZYK et al., 2016), além disso, administração sistêmica de tamoxifeno prejudicou a persistência da memória sem alterar a reconsolidação (DA SILVA et al., 2016). Estes estudos sugerem que interferências tardias após a reativação prejudicam a persistência da memória sem interferir na reconsolidação.

Os processos tardios (após a janela de reconsolidação) são associados à persistência da memória aversiva, como a segunda onda tardia da expressão da proteína Arc na amígdala basolateral e foram mostrados que ocorrem até 12 horas após sua reativação (NAKAYAMA et al., 2016). Sendo assim, para melhor investigar se a atividade da PKC no córtex PL é importante para a persistência da memória, foram avaliados os efeitos da queleritrina em grupos independentes de animais 9, 12 ou 18 horas após a reativação da memória. Os resultados demonstraram que quando a droga foi administrada 9 ou 12 horas após a reativação da memória, houve uma redução do comportamento de me-

do induzida pela droga em relação aos respectivos controles durante o Teste A₂. Porém quando os animais receberam a infusão de queleritrina 18 horas depois da sessão de reativação, não foram observadas diferenças significativas no comportamento de medo, indicando que o período no qual a PKC do córtex PL está envolvida na persistência de uma memória aversiva reativada varia de 6 a 12 horas. É importante ressaltar que os animais tratados com veículo 18 horas após a reativação da memória apresentaram menos tempo de congelamento durante o Teste A₂ quando comparados à sessão de reativação. Este resultado sugere que o aprendizado da extinção poderia ter ocorrido no grupo controle. Curiosamente, essa diferença não foi observada nos animais tratados com queleritrina. Estudos futuros são necessários para avaliar se a inibição da PKC do córtex PL afeta o processo de extinção.

Posteriormente, avaliamos se o envolvimento da PKC no mecanismo da persistência da memória, depende da reativação prévia da memória realizada através da exposição do animal ao contexto condicionado. A omissão da reativação foi realizada através da breve exposição (3 min) do animal a um contexto B, não pareado. Seria de esperar que não houvesse alterações na persistência da memória em animais com infusão de queleritrina no córtex PL 6 horas após a exposição a um contexto B. De fato, não foram observados efeitos da inibição da PKC quando a reativação da memória foi omitida, e este resultado está de acordo com estudos que indicaram que a indução de mecanismos associados à persistência é desencadeada pela reativação da memória (NAKAYAMA et al., 2013; DA SILVA et al., 2016; KRAWCZYK et al., 2016; NAKAYAMA et al., 2016).

O papel das isoformas convencionais da PKC tem sido estudado e já foi demonstrado que a PKC e suas isoformas participam de uma variedade de mecanismos biológicos no SNC e nos sistemas periféricos, além disso estudos já demonstraram a sua participação nos mecanismos de formação e manutenção da memória como em paradigmas aversivos de aprendizagem (OLDS et al., 1990; ABELIOVICH, et al., 1993; WEEBER et al., 2000; BONINI et al., 2007; SACKTOR & HELL, 2017).

Estudos recentes tem destacado o potencial envolvimento de certas isoformas atípicas da PKC, particularmente a PKM ζ , na persistência de memórias aversivas recém adquiridas (SACKTOR et al., 1993; DRIER et al., 2002; HER-

NANDEZ et al., 2003; CAI et al., 2011). Estudos relatam que a queleritrina tem afinidade por isoformas de PKC atípicas e convencionais (SERRANO et al., 2008; LING et al., 2002; RINGVOLD & KHALIL, 2017), e, portanto, foi realizado um experimento adicional no qual o inibidor seletivo de PKM ζ ZIP, foi infundido no córtex PL 6 horas após a reativação da memória. Foi observado uma redução no comportamento de medo induzido pela droga quando comparado aos controles correspondentes durante os testes A₂ e A₃. Estes resultados ressaltam que a PKM ζ é necessária para a persistência de uma memória reativada. Este resultado está de acordo com estudos que demonstram que a infusão de ZIP em outras regiões cerebrais prejudica a persistência de vários tipos de memórias recém adquiridas (LI et al., 2011; SHEMA et al., 2007; SACKTOR, 2012). Pode-se observar que os prejuízos sobre a persistência da memória promovidos pela queleritrina e pelo ZIP foram similares, e acredita-se que a ação da queleritrina em parte foi mediada pela inibição da atividade da PKM ζ .

Se o prejuízo da persistência da memória demonstrado pela queleritrina foi através da inibição da atividade da PKM ζ , será que os efeitos do ZIP também dependem da reativação das memórias? Esse resultado é de particular relevância, uma vez que a inibição da PKM ζ na ausência de reativação da memória prejudica sua persistência da memória consolidada (SHEMA et al., 2007).

A seletividade do ZIP tem sido questionada, já que em camundongos nocaute para PKM ζ o ZIP foi capaz de prejudicar a manutenção da LTP (TSOKAS et al., 2016). Outro estudo mostrou que ao utilizar camundongos nocaute para PKC ζ /PKM ζ , a intervenção farmacológica utilizando o ZIP na região CA1 do hipocampo não apresenta déficits em várias tarefas de aprendizagem e memória dependentes do hipocampo, indicando que os efeitos do ZIP são independentes da PKM ζ (VOLK et al., 2013). O estudo de Lee et al., (2013), utilizando uma abordagem genética onde foi gerado camundongos que não possuem a proteína quinase C ζ (PKC ζ) e PKM ζ (camundongos *Prkc ζ ^{-/-}*), evidenciou que o ZIP não promoveu prejuízos na aprendizagem ou na manutenção da memória, em testes de condicionamento do medo, reconhecimento de objetos, reconhecimento de localização de objetos, preferência de local condicionado (CPP) para cocaína, quando comparados com animais de linhagem selvagem,

indicando que a ausência de PKM ζ não prejudica o aprendizado e a memória em ratos, e que o ZIP pode prejudicar a manutenção da memória de recompensa mesmo quando a PKM ζ não está presente (LEE et al., 2013). Pode-se observar que o ZIP pode promover a inibição da atividade de uma isoforma PKC atípica denominada PKC ι/λ , que está associada a fases iniciais da consolidação da memória e da fase inicial da LTP (SACKTOR & HELL, 2017). Portanto, é possível alegar que os efeitos promovidos pelo ZIP estão parcialmente associados à inibição da PKM ζ . Um estudo demonstrou que em camundongos nocaute para PKM ζ ocorre um aumento da PKC ι/λ , como um mecanismo compensatório, mediando o mecanismo da persistência da memória (ZUZINA et al., 2019). Em nosso estudo, os animais não são geneticamente modificados, sendo menos provável que os efeitos promovidos por ZIP dependam de mecanismos diferentes daqueles mediados pela isoforma PKM ζ .

Segundo o estudo de Parsons & Davis (2011) os efeitos promovidos pelo ZIP podem depender da reexposição no dia seguinte a infusão da droga na amígdala basolateral quando foi utilizado o paradigma do sobressalto potencializado pelo medo (PARSONS & DAVIS, 2011). Portanto neste estudo, avaliamos se infusão intra córtex PL de ZIP 6 horas após a reativação da memória poderia reduzir ou não o comportamento de congelamento quando os animais foram testados novamente 10 dias depois, na ausência da exposição ao Teste A₁ 24 horas após a reativação. Os resultados indicam que o tempo decorrido entre a administração do ZIP e o teste A₁ não é um fator essencial que interfere na ação da droga, reforçando que o efeito do ZIP ocorre sobre os mecanismos de persistência, e não evocação da memória. Além disso, outro estudo relatou que o ZIP infundido no córtex insular prejudicou a persistência da memória de aversão ao sabor avaliada 1 mês após sua infusão (SHEMA et al., 2007). As diferenças nos protocolos e nas áreas cerebrais em que o ZIP foi infundido podem ser responsáveis pelos achados distintos observados nos trabalhos de Parsons & Davis, (2011) e Shema et al., (2007). Neste estudo investigamos os efeitos do ZIP no córtex PL na persistência da memória usando um protocolo de condicionamento do medo contextual com uma sessão inicial de familiarização. A realização de uma pré-exposição ao contexto a ser pareado contribuiu para a facilitação dos processos de aquisição da memória de longo prazo. Essa exposição também induz a expressão dos genes precoces imediatos

(IEGs) como c-Fos, Arc e Egr-1 no córtex pré-frontal medial. Além disso sugere-se que os processos de formação e manutenção da memória contextual podem depender de mecanismos no córtex pré-frontal medial desencadeados a partir do dia da pré-exposição. Portanto, a contribuição dessa região para a memória de longo prazo é maior nos protocolos com uma pré-exposição ao contexto a ser condicionado do que nos protocolos sem pré-exposição ao contexto (HEROUX et al., 2018; 2019).

Dados da literatura evidenciam que os receptores AMPA que possuem a subunidade GluA2 são críticos para a expressão da memória de longo prazo. Além disso, estudos ressaltam que a PKM ζ contribui para o mecanismo de manutenção da memória de longo prazo através do aumento da presença de receptores AMPA contendo GluA2 na membrana sináptica dos neurônios pós-sinápticos, melhorando, dessa maneira a eficiência das conexões neuronais. A aprendizagem é acompanhada pelas mudanças sinápticas, incluindo a tradução de PKM ζ , que leva à inserção de receptores AMPA no neurônio pós-sináptico. Posteriormente, a subunidade GluA2 extra atua como um "marcador" para a captura de PKM ζ junto com as proteínas que interagem com a quinase C (PICK1) e, portanto, mantém o complexo PKM ζ -PICK1 na sinapse. Assim, a atividade da PKM ζ mantém o número de receptores AMPA contendo GluA2 nas sinapses e evita a endocitose de GluA2, dessa maneira promove a manutenção das memórias ao longo do tempo (GLANZMAN, 2013). Portanto os resultados obtidos sugerem que o prejuízo da persistência da memória pode estar relacionado a redução dos receptores AMPA contendo a subunidade GluA2 no córtex PL.

6.4 A ATIVIDADE DE PKC É NECESSÁRIA PARA A RECONSOLIDAÇÃO DE UMA MEMÓRIA REATIVADA

No momento atual não se tem evidências se os mecanismos de reconsolidação e persistência da memória se sobrepõem no córtex PL. Portanto para iniciar a esclarecer essa questão, a queleritina foi administrada imediatamente após a reativação da memória de medo. Pode-se observar que ocorreu uma redução no tempo de congelamento em relação aos controles durante o Teste A₁.

Estes resultados, sugerem que a atividade da PKC também influencia a reconsolidação da memória de medo contextual e está em concordância com estudos que demonstram a importância da atividade da PKC durante a reconsolidação da memória em outras regiões do cérebro (WEEBER et al., 2000; GIRARDI et al., 2016), além de confirmar a contribuição do córtex PL para reconsolidar memórias aversivas (STERN et al., 2014; VANVOSSSEN et al., 2017; DO MONTE, et al., 2013; LEVIN et al., 2017). É importante salientar que o grupo tratado com a queleritrina também expressou menor percentual de congelamento do que os respectivos controles quando testados 7 e 21 dias depois (testes A₂ e A₃). Estudos que mostram que intervenções farmacológicas realizadas após a reativação, com o intuito de modificar a reconsolidação da memória, não estão associadas a características relacionadas à extinção, como reinstalação e recuperação espontânea da memória original do medo (STERN et al., 2012; DUVARCI, & NADER, 2004; ASTHANA et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que os efeitos da queleritrina na reconsolidação dependem da reativação da memória.

Os potenciais efeitos do ZIP na reconsolidação da memória também foram investigados administrando a droga imediatamente após a reativação. Não foram observadas alterações induzidas pela droga no tempo de congelamento em relação aos controles durante os testes A₁, A₂ e A₃. Este resultado sugere que a inibição da PKM ζ imediatamente após a reativação no córtex PL não afeta a reconsolidação nem a persistência de uma memória reativada. Foi proposto que os mecanismos de recuperação e reativação da memória possam ser parcialmente inibidos pelo ZIP. Estudos relatam que o tráfego da subunidade Glu2A do receptor AMPA em sinapses é induzido pela recuperação da memória e é necessário para a reconsolidação da memória (FERRARA et al., 2019; JAROME et al., 2012; LOPEZ et al., 2015). O mecanismo de ação do ZIP está relacionado com a inibição do tráfego da subunidade Glu2A, e, portanto, a droga poderia prejudicar a reativação da memória e desse modo pode ser que o processo de reconsolidação não tenha sido desencadeado impedindo a ação do ZIP subjacente a reativação. Além disso, já foi demonstrado que a inibição da PKM ζ na região CA1 do hipocampo dorsal, prejudicou a reconsolidação da memória espacial (ROSSATO et al., 2019). Um estudo mostrou que o aumento da atividade da PKM ζ na amígdala induzido pela reconsolidação na amígdala

estava relacionado à manutenção da memória olfativa do medo em ratos juvenis (OLIVER et al., 2016). É importante salientar que as diferenças nos paradigmas usados possam explicar os achados mistos relatados (um protocolo de memória espacial vs. memória do medo). Estudos sugerem que a PKM ζ participa do mecanismo de manutenção da memória do medo na amígdala basolateral (OLIVER et al., 2016) e no córtex PL (XUE et al., 2015), porém não há evidências da participação da mesma no hipocampo dorsal (KWAPIS et al., 2009). A idade dos animais também é um fator relevante que pode influenciar nos resultados demonstrados na literatura, uma vez que os ratos juvenis apresentam menos retenção de memória do que os adultos (ZANCA et al., 2019).

Neste estudo, para melhor esclarecer o papel do PKM ζ durante a reconsolidação de memória, outro grupo de ratos recebeu a infusão do ZIP no córtex PL 1 hora após a reativação da memória. Como ilustrado na figura 22 B, um dia depois, não foram observadas diferenças no comportamento de medo nos animais tratados com o ZIP em relação aos respectivos controles, sugerindo que neste momento não há efeitos da inibição da PKM ζ na reconsolidação da memória aversiva. Porém, pode-se observar uma redução significativa do percentual do tempo de congelamento quando comparados aos controles durante os testes A₂ e A₃, sugerindo que a atividade da PKM ζ no córtex PL está especificamente relacionada ao mecanismo da persistência da memória 1 hora após a reativação da memória. Esse resultado está de acordo com os estudos de Krawczyk et al., (2016), onde a inibição da ERK1/2 no hipocampo dorsal 3 horas após a reativação da memória manteve a memória do medo intacta um dia depois, mas a prejudicou quando os animais foram testados novamente sete dias mais tarde. Além disso, foi demonstrado recentemente que a reativação da memória induz mecanismos relacionados à reconsolidação e persistência da memória (KRAWCZYK et al., 2019; KRAWCZYK et al., 2016).

Atualmente poucos trabalhos exploram a participação de isoformas típicas ou convencionais das PKC's na reconsolidação. Bonini et al., (2007), utilizando o inibidor das PKC's convencionais e da PKC μ (nova), Go 6976, descobriram que a atividade dessas isoformas são necessária na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos para aquisição, consolidação e reconsolidação da memória espacial. Nesse sentido, pode ser que as isoformas de PKC's típicas e novas estão envolvidas durante o processo de reconsolidação e a iso-

forma atípica PKM ζ está envolvida apenas no mecanismo de persistência da memória.

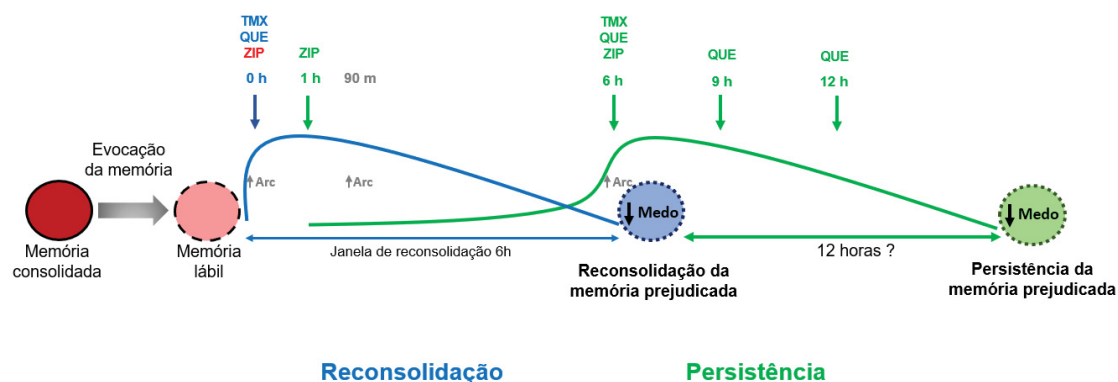
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em geral, os dados deste estudo mostram que a atividade da PKC é necessária para a reconsolidação e para a persistência de uma memória reativada (Figura 27). Além disso, a PKM ζ no córtex PL participa do mecanismo da persistência de uma memória aversiva. A inibição da PKC imediatamente após a reativação prejudicou a reconsolidação da memória. Estes resultados são relevantes pois confirma achados anteriores quando o tamoxifeno foi administrado sistemicamente (da Silva et al., 2016). Adicionalmente, demonstramos que a administração do tamoxifeno e da queleritrina 6 horas após a reativação prejudicou especificamente a persistência da memória, sem interferir na reconsolidação. Além disso, quando a queleritrina foi administrada 9 e 12 horas após a reativação o prejuízo sobre o mecanismo da persistência da memória também foi observado.

A PKM ζ no córtex PL está envolvida na persistência de uma memória de medo contextual reativada. Os resultados indicam que ao administrar o ZIP 1 hora e 6 horas após a reativação da memória ocorreu o prejuízo específico da persistência da memória. Ao administrar o ZIP imediatamente após a reativação foi observado a ausência do efeito do ZIP sugerindo, uma contribuição diferencial das PKC's convencionais durante a reconsolidação da memória e da PKM ζ para a persistência da memória após a reativação.

Os achados deste trabalho podem gerar uma outra hipótese relacionada ao processo de evocação das memórias, onde mecanismos distintos podem ser gerados a partir da reativação das memórias, sendo que o primeiro mecanismo poderia levar a reconsolidação das memórias e o segundo poderia contribuir para a persistência das memórias.

FIGURA 27 - INTERFERÊNCIAS FARMACOLÓGICAS EM UMA JANELA ESTENDIDA APÓS A REATIVAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO, PODEM PROMOVER O PREJUÍZO SOBRE A RECONSOLIDAÇÃO OU SOBRE A PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA AVERSIVA



Os principais achados deste trabalho evidenciam que interferências farmacológicas tardias após a reativação da memória aversiva prejudicam a persistência da memória, sem interferir na reconsolidação. Em azul são representados os eventos relacionados ao mecanismo da reconsolidação da memória de medo. Inicialmente foi demonstrado que a administração do tamoxifeno e da queleritrina imediatamente após a reativação prejudica a reconsolidação da memória, porém quando o ZIP foi administrado imediatamente após a reativação não foi observado nenhuma diferença nos mecanismos adjacentes a reativação (em vermelho). Em verde são representados os efeitos da administração de tamoxifeno (TMX), queleritrina (QUE) e ZIP em diferentes intervalos de tempo. Nota-se que ao administrar o tamoxifeno, a queleritrina e o ZIP 6 horas após a reativação, ocorreu um prejuízo da persistência da memória de medo. Ao administrar a queleritrina 9 e 12 horas após a reativação, o prejuízo na persistência da memória também foi observado. Além disso quando o ZIP foi administrado 1 hora após a reativação houve prejuízo na persistência da memória sem interferir na reconsolidação da memória de medo.

8. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados demonstrados neste estudo confirmam a hipótese de que a atividade das proteínas PKC e da isoforma atípica PKM ζ no PL estaria envolvida com a reconsolidação e com a persistência da memória induzida pela reativação. Os principais achados foram observados quando a infusão do tamoxifeno, da queleritrina e do ZIP foi realizada em uma janela temporal tardia. Além disso, foi mostrado que a inibição da PKC imediatamente após a reativação a reconsolidação da memória foi prejudicada.

Estudos futuros poderiam abordar detalhadamente quais isoformas da PKC participam de cada processo da memória no córtex PL. No total, os achados atuais indicam que a PKC e PKM ζ presentes no o córtex PL estão envolvidas na reconsolidação e persistência de uma memória de medo contextual reativada. Ademais, os resultados demonstraram que, após o término da janela de tempo de reconsolidação, existe uma oportunidade estendida para mitigar a memória do medo.

9. REFERÊNCIAS

- ABELIOVICH, A.; PAYLOR, R.; CHEN, C.; et al. PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. **Cell**, v. 75, n. 7, p. 1263–1271, 1993.
- AKERS, R.F.; LOVINGER, D.M.; COLLEY, P.A.; LINDEN, D.J.; ROUTTENBERG, A. Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. **Science**, v.23, n. 1, p. 587-589, 1986.
- ALBERINI, C. M.; LEDOUX, J. E. Memory reconsolidation. **Current Biology**, v.23, n. 17, p. 46-50, 2013.
- ALMEY, A.; CANNELL, E.; BERTRAM, K.; et al. Medial prefrontal cortical estradiol rapidly alters memory system bias in female rats: Ultrastructural analysis reveals membrane-associated estrogen receptors as potential mediators. **Endocrinology**, v. 155, n. 11, p. 4422–4432, 2014.
- ASCHER, P.; NOWAK, L. Early biophysics of the NMDA receptor channel. **Journal of Physiology**, v.587, n. 19, p. 4563-4564, 2009.
- ASTHANA, M. K.; BRUNHUBER, B.; MÜHLBERGER, A.; et al. Preventing the Return of Fear Using Reconsolidation Update Mechanisms Depends on the Met-Allele of the Brain Derived Neurotrophic Factor Val66Met Polymorphism. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 6, 2016.
- BALTACI, S. B.; MOGULKOC, R.; BALTACI, A. K. Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 2, p. 281-296, 2019.
- BARRIA, A.; DERKACH, V.; SODERLING, T. Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 52, p. 32727–32730, 1997.
- BEAR, M. F. A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 13453–13459, 1996.
- BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IGAZ, L. M.; et al. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, v. 53, n. 2, p. 261–277, 2007.
- BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; KATCHE, C.; et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n.7, p. 0–5, 2007.
- BLISS, T. V. P.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term

potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31–39, 1993.

BLISS, T. V. P.; LØMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of Physiology**, v. 232, n. 2, p. 331–356, 1973.

BOELE, F. W.; SCHILDER, C. M. T.; DE ROODE, M. LOU; DEIJEN, J. B.; SCHAGEN, S. B. Cognitive functioning during long-term tamoxifen treatment in postmenopausal women with breast cancer. **Menopause**, v. 22, n. 1, p. 17–25, 2015.

BONINI, J. S.; DA SILVA, W. C.; BEVILAQUA, L. R. M.; et al. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Neuroscience**, v. 147, n. 1, p. 37–45, 2007.

BONINI, J. S.; CAMMAROTA, M.; KERR, D. S.; BEVILAQUA, L. R. M.; IZQUIERDO, I. Inhibition of PKC in basolateral amygdala and posterior parietal cortex impairs consolidation of inhibitory avoidance memory. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 80, n. 1, p. 63–67, 2005.

BORNER, C.; FILIPUZZI, I.; WARTMANN, M.; EPPENBERGER, U.; FABBRO, D. Biosynthesis and posttranslational modifications of protein kinase C in human breast cancer cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 264, n. 23, p. 13902–13909, 1989.

BORODINOVA, A. A.; ZUZINA, A. B.; BALABAN, P. M. Role of atypical protein kinases in maintenance of long-term memory and synaptic plasticity. **Biochemistry (Moscow)**, v. 82, n. 3, p. 243–256, 2017.

BRAMHAM, C. R.; ALME, M. N.; BITTINS, M.; et al. The Arc of synaptic memory. **Experimental Brain Research**, v. 200, n. 2, p. 125–140, 2010.

BROWN, T. H.; CHAPMAN, P. F.; KAIRISS, E. W.; KEENAN, C. L. Long-term synaptic potentiation. **Science**, v. 242, n. 4879, p. 724–728, 1988.

BURCHULADZE, R.; POTTER, J.; ROSE, S. P. R. Memory formation in the chick depends on membrane-bound protein kinase C. **Brain Research**, v. 535, n. 1, p. 131–138, 1990.

BURGOS-ROBLES, A.; VIDAL-GONZALEZ, I.; QUIRK, G. J. Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 26, p. 8474–8482, 2009.

CAI, D.; PEARCE, K.; CHEN, S.; GLANZMAN, D. L. Protein kinase m maintains long-term sensitization and long-term facilitation in Aplysia. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 17, p. 6421–6431, 2011.

CASTAGNA, M.; TAKAI, Y.; KAIBUCHI, K.; et al. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 13, p. 7847–7851, 1982.

CHARNIAK, E., MCDERMOTT, D. Introduction to artificial intelligence. Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc. Boston, MA, USA. 1985.

CHAU, D.D.L.; LAU, K.F. The roles of atypical protein kinase Cs (aPKCs) in the nervous system: targets for neuroregeneration? **Neural Regeneration Research**, v. 15, n. 8, p. 1475-1476, 2020.

CHEN, D. Y.; BAMBAH-MUKKU, D.; POLLONINI, G.; ALBERINI, C. M. Glucocorticoid receptors recruit the CaMKII α -BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 12, p. 1707–1714, 2012.

CHOI, K.; LE, T.; XING, G.; JOHNSON, L. R.; URSANO, R. J. Analysis of Kinase Gene Expression in the Frontal Cortex of Suicide Victims: Implications of Fear and Stress. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 1–9, 2011.

COLOMBO, P. J.; WETSEL, W. C.; GALLAGHER, M. Spatial memory is related to hippocampal subcellular concentrations of calcium-dependent protein kinase C isoforms in young and aged rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 25, p. 14195–14199, 1997.

COUSSENS, L.; PARKER, P. J.; RHEE, L.; et al. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. **Science**, v. 233, n. 4766, p. 859–866, 1986.

DA SILVA, T. R.; RAYMUNDI, A. M.; BERTOGLIO, L. J.; ANDREATINI, R.; STERN, C. A. Role of prelimbic cortex PKC and PKM ζ in fear memory reconsolidation and persistence following reactivation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 4076, 2020.

DA SILVA, T. R.; TAKAHASHI, R. N.; BERTOGLIO, L. J.; ANDREATINI, R.; STERN, C. A. J. Evidence for an expanded time-window to mitigate a reactivated fear memory by tamoxifen. **European Neuropsychopharmacology** v. 26, n. 10, p. 1601–1609, 2016.

DE LA FUENTE, V.; FEDERMAN, N.; ZALCMAN, G.; et al. NF- κ B transcription factor role in consolidation and reconsolidation of persistent memories. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, n. 9, p. 1–9, 2015.

DÉBIEC, J.; LEDOUX, J. E. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. **Neuroscience**, v. 129, n. 2, p. 267–272, 2004.

DENARDO, L. A.; LIU, C. D.; ALLEN, W. E.; et al. Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 460–469, 2019.

DERIEMER, S. A.; STRONG, J. A.; ALBERT, K. A.; GREENGARD, P.; KACZMAREK, L. K. Enhancement of calcium current in *Aplysia* neurones by phorbol ester and protein kinase C. **Nature**, v. 313, n. 6000, p. 313–316, 1985.

DO MONTE, F. H.; SOUZA, R. R.; WONG, T. T.; CAROBREZ, A. DE P. Systemic or intra-prelimbic cortex infusion of prazosin impairs fear memory reconsolidation. **Behavioural Brain Research**, v. 244, n.10, p. 137–141, 2013.

DRIER, E. A.; TELLO, M. K.; COWAN, M.; et al. Memory enhancement and formation by atypical PKM activity in *Drosophila melanogaster*. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 4, p. 316–324, 2002.

DSM-5. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais - 5ª Edição. Psychiatric Association, A. 2013.

DUDAI, Y. Molecular bases of long-term memories: A question of persistence. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 2, p. 211-216, 2002.

DUVARCI, S.; NADER, K. Characterization of Fear Memory Reconsolidation. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 42, p. 9269–9275, 2004.

EINARSSON, E. O.; NADER, K. Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory. **Learning & Memory**, v. 19, n. 10, p. 449–452, 2012.

ELLIS, P. D. The essential guide to effect sizes: statistical power, meta-analysis, and the interpretation of research results. Cambridge University Press. 2010.

ESPEJO, P. J.; ORTIZ, V.; MARTIJENA, I. D.; MOLINA, V. A. Stress-induced resistance to the fear memory labilization/reconsolidation process. Involvement of the basolateral amygdala complex. **Neuropharmacology**, v. 109, n.9, p. 349–356, 2016.

FANI, N.; KING, T. Z.; JOVANOVIĆ, T.; et al. White matter integrity in highly traumatized adults with and without post-traumatic stress disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 12, p. 2740–2746, 2012.

FERRARA, N. C.; JAROME, T. J.; CULLEN, P. K.; et al. GluR2 endocytosis-dependent protein degradation in the amygdala mediates memory updating. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5180, 2019.

FONZO, G. A.; SIMMONS, A. N.; THORP, S. R.; et al. Exaggerated and disconnected insular-amygdalar blood oxygenation level-dependent response to threat-related emotional faces in women with intimate-partner violence posttraumatic stress disorder. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 5, p. 433–441, 2010.

FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B. Fast track to the medial prefrontal cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

America, v. 103, n. 3, p. 509-510, 2006.

FRANKLAND, P. W.; DING, H. K.; TAKAHASHI, E.; et al. Stability of recent and remote contextual fear memory. **Learning & Memory**, v. 13, n. 4, p. 451–457, 2006.

GAZARINI, L.; STERN, C. A. J.; CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting α 1- and β -adrenergic receptors. **Learning & memory**, v. 20, n. 4, p. 210–219, 2013.

GIRARDI, B. A.; RIBEIRO, D. A.; SIGNOR, C.; et al. Spermidine-induced improvement of reconsolidation of memory involves calcium-dependent protein kinase in rats. **Learning & Memory**, v. 23, n. 1, p. 21–28, 2016.

GLANZMAN, D. L. PKM and the maintenance of memory. **F1000 Biology Reports**, v. 5, n. 4, p. 1–9, 2013.

GONZALEZ, M. C.; KRAMAR, C. P.; TOMAIUOLO, M.; et al. Medial prefrontal cortex dopamine controls the persistent storage of aversive memories. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 408, 2014.

GUZOWSKI, J. F.; MCNAUGHTON, B. L.; BARNES, C. A.; WORLEY, P. F. Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. **Nature Neuroscience**, v. 2, n. 12, p. 1120–1124, 1999.

HEBB D. O. The Organisation of Behaviour. New York: Wiley. 1949.

HEIDBREDER, C. A.; GROENEWEGER, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: Evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 6, p. 555-579, 2003.

HERNANDEZ, A. I.; BLACE, N.; CRARY, J. F.; et al. Protein kinase M ζ synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C ζ catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 41, p. 40305–40316, 2003.

HEROUX, N. A.; HORGAN, C. J.; PINIZZOTTO, C. C.; ROSEN, J. B.; STANTON, M. E. Medial prefrontal and ventral hippocampal contributions to incidental context learning and memory in adolescent rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 166, n. 3, p. 107091, 2019.

HEROUX, N. A.; OSBORNE, B. F.; MILLER, L. A.; et al. Differential expression of the immediate early genes c-Fos, Arc, Egr-1, and Npas4 during long-term memory formation in the context preexposure facilitation effect (CPFE). **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 147, n.1, p. 128–138, 2018.

HERRICK, S. P.; WATERS, E. M.; DRAKE, C. T.; MCEWEN, B. S.; MILNER, T.

A. Extranuclear estrogen receptor beta immunoreactivity is on doublecortin-containing cells in the adult and neonatal rat dentate gyrus. **Brain research**, v. 1121, n. 1, p. 46–58, 2006.

HERRY, C.; HERRY, C.; CIOCCHI, S.; et al. Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. **Nature**, v. 454, n. 7204, p. 600–606, 2008.

HOOVER, W. B.; VERTES, R. P. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. **Brain Structure and Function**, v. 212, n. 2, p. 149–179, 2007.

HORGAN, K.; COOKE, E.; HALLETT, M. B.; MANSEL, R. E. Inhibition of protein kinase C mediated signal transduction by tamoxifen. Importance for antitumour activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n. 24, p. 4463–4465, 1986.

HSIEH, C.; TSOKAS, P.; SERRANO, P.; et al. Persistent increased PKM ζ in long-term and remote spatial memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 138, n.7, p. 135–144, 2017.

HU, G. Y.; HVALBY, O.; WALAAS, S. I.; et al. Protein kinase C injection into hippocampal pyramidal cells elicits features of long term potentiation. **Nature**, v. 328, n. 6129, p. 426–429, 1988.

HUANG, K. P.; CHAN, K. F.; SINGH, T. J.; NAKABAYASHI, H.; HUANG, F. L. Autophosphorylation of rat brain Ca²⁺-activated and phospholipid-dependent protein kinase. **The Journal of biological chemistry**, v. 261, n. 26, p. 12134–12140, 1986.

INOUE, M.; KISHIMOTO, A.; TAKAI, Y.; NISHIZUKA, Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. **The Journal of biological chemistry**, v. 252, n. 21, p. 7610–7616, 1977.

JAKEN, S. Protein kinase C isozymes and substrates. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, n. 2, p. 168–173, 1996.

JANICAK, P. G.; DAVIS, J. M.; PRESKORN, S. H.; AYD, F. J.; MARDER, S. R.; PAVULURI, M. N. Assessment and Treatment of Anxiety-Related Disorders. em: Principles & Practice of Psychopharmacotherapy, 4th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

JAROME, T. J.; KWAPIS, J. L.; WERNER, C. T.; et al. The timing of multiple retrieval events can alter GluR1 phosphorylation and the requirement for protein synthesis in fear memory reconsolidation. **Learning & Memory**, v. 19, n. 7, p. 300–306, 2012.

JUNG, M. W.; MCNAUGHTON, B. L. Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. **Hippocampus**, v. 3, n. 2, p. 165–182, 1993.

KATCHE, C.; BEKINSCHTEIN, P.; SLIPCZUK, L.; et al. Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 1, p. 349–354, 2010.

KAWAHARA, Y.; TAKAI, Y.; MINAKUCHI, R.; SANO, K.; NISHIZUKA, Y. Phospholipid turnover as a possible transmembrane signal for protein phosphorylation during human platelet activation by thrombin. **Topics in Catalysis**, v. 97, n. 1, p. 309–317, 1980.

KESSELS, H. W.; MALINOW, R. Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. **Neuron**, v. 61, n. 3, p. 340–350, 2009.

KIDA, S. Reconsolidation/destabilization, extinction and forgetting of fear memory as therapeutic targets for PTSD. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 1, p. 49–57, 2019.

KIKKAWA, U.; TAKAI, Y.; MINAKUCHI, R.; INOHARA, S.; NISHIZUKA, Y. Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. Subcellular distribution, purification, and properties. **The Journal of biological chemistry**, v. 257, n. 22, p. 13341–13348, 1982.

KISHIMOTO, A.; TAKAI, Y.; MORI, T.; KIKKAWA, U.; NISHIZUKA, Y. Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. **The Journal of biological chemistry**, v. 255, n. 6, p. 2273–2276, 1980.

KORB, E.; FINKBEINER, S. Arc in synaptic plasticity: From gene to behavior. **Trends in Neurosciences**, v. 34, n. 11, p. 591–598, 2011.

KRAFT, A. S.; ANDERSON, W. B. Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. **Nature**, v. 301, n. 5901, p. 621–623, 1983.

KRAFT, A. S.; ANDERSON, W. B.; COOPER, H. L.; SANDO, J. J. Decrease in cytosolic calcium/phospholipid-dependent protein kinase activity following phorbol ester treatment of EL4 thymoma cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 257, n. 22, p. 13193–13196, 1982.

KRAWCZYK, M. C.; MILLAN, J.; BLAKE, M. G.; FELD, M.; BOCCIA, M. M. Relevance of ERK1/2 post-retrieval participation on memory processes: Insights in their particular role on reconsolidation and persistence of memories. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, n.1, p. 95, 2019.

KRAWCZYK, M. C.; NAVARRO, N.; BLAKE, M. G.; et al. Reconsolidation-induced memory persistence: Participation of late phase hippocampal ERK activation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 133, n. 2, p. 79–88, 2016.

KWAPIS, J. L.; JAROME, T. J.; LONERGAN, M. E.; HELMSTETTER, F. J. Protein Kinase Mzeta Maintains Fear Memory in the Amygdala but Not in the Hippocampus. **Behavioral Neuroscience**, v. 123, n. 4, p. 844–850, 2009.

LAFERRIÈRE, A.; PITCHER, M. H.; HALDANE, A.; et al. PKM ζ is essential for spinal plasticity underlying the maintenance of persistent pain. **Molecular Pain**, v. 7, n. 1, p. 99, 2011.

LEE, A. M.; KANTER, B. R.; WANG, D.; et al. Prkcz null mice show normal learning and memory. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 416–419, 2013.

LEVIN, N.; KRITMAN, M.; MAROUN, M.; AKIRAV, I. Differential roles of the infralimbic and prelimbic areas of the prefrontal cortex in reconsolidation of a traumatic memory. **European Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 9, p. 900–912, 2017.

LI, Q.; LIU, X.-S.; ZENG, Q.-W.; et al. Post-training intra-basolateral amygdala infusions of norepinephrine block sevoflurane-induced impairment of memory consolidation and activity-regulated cytoskeletal protein expression inhibition in rat hippocampus. **Neurobiology of learning and memory**, v. 96, n. 3, p. 492–497, 2011.

LICHTENFELS, M.; DORNELLES, A. DA S.; PETRY, F. D. S.; et al. The anticancer estrogen receptor antagonist tamoxifen impairs consolidation of inhibitory avoidance memory through estrogen receptor alpha. **Journal of neural transmission**, v. 124, n. 11, p. 1331–1339, 2017.

LING, D. S. F.; BENARDO, L. S.; SACKTOR, T. C. Protein kinase M ζ enhances excitatory synaptic transmission by increasing the number of active postsynaptic AMPA receptors. **Hippocampus**, v. 16, n. 5, p. 443–452, 2006.

LING, S.; LITTLE, P. J.; WILLIAMS, M. R. I.; et al. High glucose abolishes the antiproliferative effect of 17 β -estradiol in human vascular smooth muscle cells. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 282, n. 4, p. 45-54, 2002.

LINK, W.; KONIETZKO, U.; KAUSELMANN, G.; et al. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 12, p. 5734–5738, 1995.

LIU, F.; DAY, M.; MUÑIZ, L. C.; et al. Activation of estrogen receptor- β regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 334–343, 2008.

LIU, J. P. Protein kinase C and its substrates. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 116, n. 1, p. 1–29, 1996.

LIU, W. S.; HECKMAN, C. A. The sevenfold way of PKC regulation. **Cellular Signalling**, v. 10, n. 8, p. 529-542, 1998.

LOPEZ, J.; GAMACHE, K.; SCHNEIDER, R.; NADER, K. Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 6, p. 2465–2475, 2015.

LYFORD, G. L.; YAMAGATA, K.; KAUFMANN, W. E.; et al. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. **Neuron**, v. 14, n. 2, p. 433–445, 1995.

MA, L.; WANG, D. D.; ZHANG, T. Y.; et al. Region-specific involvement of BDNF secretion and synthesis in conditioned taste aversion memory formation. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 6, p. 2079–2090, 2011.

MADDOX, S. A.; SCHAFE, G. E. The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc/Arg3.1) is required for reconsolidation of a pavlovian fear memory. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 19, p. 7073–7082, 2011.

MAKINO, Y.; POLYGALOV, D.; BOLAÑOS, F.; BENUCCI, A.; MCHUGH, T. J. Physiological Signature of Memory Age in the Prefrontal-Hippocampal Circuit. **Cell Reports**, v. 29, n. 12, p. 3835–3846, 2019.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248–251, 2000.

MCKLVEEN, J. M.; MYERS, B.; HERMAN, J. P. The Medial Prefrontal Cortex: Coordinator of Autonomic, Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 27, n. 6, p. 446–456, 2015.

MCPHAIL, L. C.; CLAYTON, C. C.; SNYDERMAN, R. A potential second messenger role for unsaturated fatty acids: Activation of Ca²⁺-dependent protein kinase. **Science**, v. 224, n. 4649, p. 622–625, 1984.

MESSAOUDI, E.; KANHEMA, T.; SOULÉ, J.; et al. Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 39, p. 10445–10455, 2007.

MICHOPOULOS, V.; NORRHOLM, S. D.; JOVANOVIC, T. Diagnostic Biomarkers for Posttraumatic Stress Disorder: Promising Horizons from Translational Neuroscience Research. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 5, p. 344–353, 2015.

MIGUES, P. V.; HARDT, O.; WU, D. C.; et al. PKM ζ maintains memories by regulating GluR2- dependent AMPA receptor trafficking. **Nature**, v. 13, n. 5, p. 630–634, 2010.

MILNER, T. A.; AYOOLA, K.; DRAKE, C. T.; et al. Ultrastructural localization of estrogen receptor β immunoreactivity in the rat hippocampal formation. **Journal of Comparative Neurology**, v. 491, n. 2, p. 81–95, 2005.

MITRA, S. W.; HOSKIN, E.; YUDKOVITZ, J.; et al. Immunolocalization of

estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. **Endocrinology**, v. 144, n. 5, p. 2055–2067, 2003.

MURAKAMI, K.; ROUTTENBERG, A. Direct activation of purified protein kinase C by unsaturated fatty acids (oleate and arachidonate) in the absence of phospholipids and Ca^{2+} . **FEBS Letters**, v. 192, n. 2, p. 189–193, 1985.

NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 722–726, 2000.

NAKAYAMA, D.; HASHIKAWA-YAMASAKI, Y.; IKEGAYA, Y.; MATSUKI, N. Late Arc / Arg3.1 expression in the basolateral amygdala is essential for persistence of newly-acquired and reactivated contextual fear memories. **Scientific Reports**, v. 16, n. 6, p. 21007, 2016.

NAKAYAMA, D.; IWATA, H.; TESHIROGI, C.; et al. Long-delayed expression of the immediate early gene Arc/Arg3.1 refines neuronal circuits to perpetuate fear memory. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 2, p. 819–830, 2015.

NAKAYAMA, D.; YAMASAKI, Y.; MATSUKI, N.; NOMURA, H. Post-retrieval late process contributes to persistence of reactivated fear memory. **Learning & Memory**, v. 20, n. 6, p. 307–310, 2013.

NIKITIN, V. P.; KOZYREV, S. A.; SOLNTSEVA, S. V. Reconsolidation of Reminder-Induced Amnesia: Role of NMDA and AMPA Glutamate Receptors. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 160, n. 1, p. 1–5, 2015.

NISHIZUKA, Y. Studies and prospectives of protein kinase C in signal transduction. **Journal of Japan Haematological Society**, v. 51, n. 8, p. 1321–1326, 1988.

NOGUÈS, X.; JAFFARD, R.; MICHEAU, J. Investigations on the role of hippocampal protein kinase C on memory processes: Pharmacological approach. **Behavioural Brain Research**, v. 75, n. 1–2, p. 139–146, 1996.

NOWAK, L.; BREGESTOVSKI, P.; ASCHER, P.; HERBET, A.; PROCHIANTZ, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. **Nature**, v. 307, n. 5950, p. 462–465, 1984.

O'BRIAN, C. A.; IOANNIDES, C. G.; WARD, N. E.; LISKAMP, R. M. Inhibition of protein kinase C and calmodulin by the geometric isomers cis- and trans-tamoxifen. **Biopolymers**, v. 29, n. 1, p. 97–104, 1990.

OHNO, S.; KAWASAKI, H.; KONNO, Y.; et al. A Fourth Type of Rabbit Protein Kinase C. **Biochemistry**, v. 27, n. 6, p. 2083–2087, 1988.

OLDS, J. L.; GOLSKI, S.; MCPHIE, D. L.; et al. Discrimination learning alters the distribution of protein kinase C in the hippocampus of rats. **The Journal of neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 3707–3713, 1990.

OLIVER, C. F.; KABITZKE, P.; SERRANO, P.; et al. Repeated recall and PKM ζ maintain fear memories in juvenile rats. **Learning & Memory**, v. 23, n. 12, p. 710–713, 2016.

PANJA, D.; DAGYTE, G.; BIDINOSTI, M.; et al. Novel translational control in arc-dependent long term potentiation consolidation in Vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 46, p. 31498–31511, 2009.

PARSONS, R. G.; DAVIS, M. Temporary disruption of fear-potentiated startle following PKM ζ . **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 295–296, 2011.

PARSONS, R. G.; RESSLER, K. J. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 146–153, 2013.

PASTALKOVA, E.; SERRANO, P.; PINKHASOVA, D.; et al. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1141–1444, 2006.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact 6^a ed. *Academic Press*, San Diego. 2009.

PETERS, J.; KALIVAS, P. W.; QUIRK, G. J. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. **Learning & Memory**, v. 16, n. 5, p. 279–288, 2009.

PITMAN, R. K.; RASMUSSEN, A. M.; KOENEN, K. C.; et al. Biological studies of post-traumatic stress disorder. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 11, p. 769–787, 2012.

PRZYBYSLAWSKI, J.; SARA, S. J. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Behavioural Brain Research**, v. 84, n. 1-2, p. 241–246, 1997.

RAO, V. R.; PINTCHOVSKI, S. A.; CHIN, J.; et al. AMPA receptors regulate transcription of the plasticity-related immediate-early gene Arc. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 887–895, 2006.

RAMIREZ-AMAYA, V.; ANGULO-PERKINS, A.; CHAWLA, M. K.; BARNES, C. A.; ROSI, S. Sustained transcription of the immediate early gene arc in the dentate gyrus after spatial exploration. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 4, p. 1631–1639, 2013.

RAYMUNDI, A. M.; DA SILVA, T. R.; ZAMPRONIO, A. R.; et al. A time-dependent contribution of hippocampal CB1, CB2 and PPAR γ receptors to cannabidiol-induced disruption of fear memory consolidation. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 4, p. 945–957, 2020.

RINGVOLD, H. C.; KHALIL, R. A. Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders. **Advances**

in **pharmacology**, v. 78, n.1, p. 203–301, 2017.

ROBERSON, E. D.; ENGLISH, J. D.; ADAMS, J. P.; et al. The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 11, p. 4337–4348, 1999.

ROCKLAND, K. Axons and Brain Architecture. 1^a Edition. Academic Press. 2015.

ROSSATO, J. I.; GONZALEZ, M. C.; RADISKE, A.; et al. PKM ζ Inhibition Disrupts Reconsolidation and Erases Object Recognition Memory. **The Journal of neuroscience**, v. 39, n. 10, p. 1828–1841, 2019.

ROUGEMONT-BÜCKING, A.; LINNMAN, C.; ZEFFIRO, T. A.; et al. Altered processing of contextual information during fear extinction in PTSD: An fMRI study. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 17, n. 4, p. 227–236, 2011.

ROUTTENBERG, A.; LOVINGER, D. M.; STEWARD, O. Selective increase in phosphorylation of a 47-kDa protein (F1) directly related to long-term potentiation. **Behavioral and Neural Biology**, v. 43, n. 1, p. 3–11, 1985.

ROUTTENBERG, A.; CANTALLOPS, I.; ZAFFUTO, S.; SERRANO, P.; NAMGUNG, U. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 13, p. 7657–7662, 2000.

SACKTOR, T. C. Memory maintenance by PKMzeta - an evolutionary perspective. **Molecular Brain**, v. 5, n. 1, p. 31, 2012.

SACKTOR, T. C.; HELL, J. W. The genetics of PKM ζ and memory maintenance. **Science signaling**, v. 10, n. 505, p.1-15, 2017.

SACKTOR, T. C.; OSTEN, P.; VALSAMIS, H.; et al. Persistent activation of the ζ isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 18, p. 8342–8346, 1993.

SAJIKUMAR, S.; NAVAKKODE, S.; SACKTOR, T. C.; FREY, J. U. Synaptic tagging and cross-tagging: The role of protein kinase M ζ in maintaining long-term potentiation but not long-term depression. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 24, p. 5750–5756, 2005.

SCHUETTE, S. R. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, D.; LAMLA, T.; ROSENBROCK, H.; HOBSON, S. Overexpression of protein kinase M ζ in the hippocampus enhances long-term potentiation and long-term contextual but not cued fear memory in rats. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 15, p. 4313–4324, 2016.

SCHLICHTING, M. L.; PRESTON, A. R. Hippocampal–medial prefrontal circuit

supports memory updating during learning and post-encoding rest. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 134, n. 1, p. 91–106, 2016.

SERRANO, P.; FRIEDMAN, E. L.; KENNEY, J.; et al. PKM ζ maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. **PLoS Biology**, v. 6, n. 12, p. 2698–2706, 2008.

SHEMA, R.; HARAMATI, S.; RON, S.; et al. Enhancement of consolidated long-term memory by overexpression of protein kinase M ζ in the neocortex. **Science**, v. 331, n. 6021, p. 1207–1210, 2011.

SHEMA, R.; SACKTOR, T. C.; DUDAI, Y. Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM ζ . **Science**, v. 317, n. 5840, p. 951–953, 2007.

SHEPHERD, J. D.; BEAR, M. F. New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 279–284, 2011.

SHI, J.; FU, L.-B.; YU, L.-C. Involvement of protein kinase C in the galanin-induced antinociception in the brain of rats. **Neuroscience letters**, v. 497, n. 1, p. 60–63, 2011.

SHUGHRUE, P. J.; LANE, M. V.; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. **Journal of Comparative Neurology**, v. 388, n. 4, p. 507–525, 1997.

SOSSIN, W. S.; SACKTOR, T. C.; SCHWARTZ, J. H. Persistent activation of protein kinase C during the development of long-term facilitation in Aplysia. **Learning & Memory**, v. 1, n. 3, p. 189–202, 1994.

SOULÉ, J.; PENKE, Z.; KANHEMA, T.; et al. Object-place recognition learning triggers rapid induction of plasticity-related immediate early genes and synaptic proteins in the rat dentate gyrus. **Neural plasticity**, v. 2008, n. 269097, p. 1–12, 2008.

SPENCER-SEGAL, J. L.; TSUDA, M. C.; MATTEI, L.; et al. Estradiol acts via estrogen receptors alpha and beta on pathways important for synaptic plasticity in the mouse hippocampal formation. **Neuroscience**, v. 202, n.4, p. 131–146, 2012.

STEFANACCI, L.; AMARAL, D. G. Some observations on cortical inputs to the macaque monkey amygdala: An anterograde tracing study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 451, n. 4, p. 301–323, 2002.

STERN, C. A. J.; GAZARINI, L.; VANVOSSSEN, A. C.; et al. δ 9-Tetrahydrocannabinol alone and combined with cannabidiol mitigate fear memory through reconsolidation disruption. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 6, p. 958–965, 2015.

STERN, C. A. J.; GAZARINI, L.; TAKAHASHI, R. N.; GUIMARÃES, F. S.;

BERTOGLIO, L. J. On Disruption of Fear Memory by Reconsolidation Blockade: Evidence from Cannabidiol Treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 9, p. 2132–2142, 2012.

STERN, C. A. J.; GAZARINI, L.; VANVOSSSEN, A. C.; HAMES, M. S.; BERTOGLIO, L. J. Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. **Learning & Memory**, v. 21, n. 1, p. 14–20, 2014.

STEWART, O.; WALLACE, C. S.; LYFORD, G. L.; WORLEY, P. F. Synaptic activation causes the mRNA for the leg Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. **Neuron**, v. 21, n. 4, p. 741–751, 1998.

TAKAI, Y.; KISHIMOTO, A.; INOUE, M.; NISHIZUKA, Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. **The Journal of biological chemistry**, v. 252, n. 21, p. 7603–7609, 1977b.

TAKAI, Y.; KISHIMOTO, A.; KIKKAWA, U.; MORI, T.; NISHIZUKA, Y. Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 91, n. 4, p. 1218–1224, 1979.

TAKAI, Y.; YAMAMOTO, M.; INOUE, M.; KISHIMOTO, A.; NISHIZUKA, Y. A proenzyme of cyclic nucleotide-independent protein kinase and its activation by calcium-dependent neutral protease from rat liver. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 77, n. 2, p. 542–550, 1977a.

TALEBI, A.; NAGHDI, N.; SEPEHRI, H.; REZAYOF, A. The Role of Estrogen Receptors on Spatial Learning and Memory in CA1 Region of Adult Male Rat Hippocampus. **Iranian journal of pharmaceutical research**, v. 9, n. 2, p. 183–191, 2010.

TSOKAS, P.; HSIEH, C.; YAO, Y.; et al. Compensation for PKM ζ in long-term potentiation and spatial long-term memory in mutant mice. **eLife**, v. 5, n. e14846, p. 1–22, 2016.

VANVOSSSEN, A. C.; PORTES, M. A. M.; SCOZ-SILVA, R.; et al. Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 137, n.5, p. 154–162, 2017.

VERTES, R. P. Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. **Synapse**, v. 51, n. 1, p. 32–58, 2004.

VOLK, L. J.; BACHMAN, J. L.; JOHNSON, R.; YU, Y.; HUGANIR, R. L. PKM- ζ is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 420–423, 2013.

WANG, S.; SHENG, T.; REN, S.; TIAN, T.; LU, W. Distinct Roles of PKC α/λ and

PKM ζ in the Initiation and Maintenance of Hippocampal Long-Term Potentiation and Memory. **Cell reports**, v. 16, n. 7, p. 1954–1961, 2016.

WANG, Y.; ZHANG, T. Y.; XIN, J.; et al. Differential Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Reconsolidation and Consolidation of Conditioned Taste Aversion Memory. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49942, 2012.

WEBB, W. M.; SANCHEZ, R. G.; PEREZ, G.; et al. Dynamic association of epigenetic H3K4me3 and DNA 5hmC marks in the dorsal hippocampus and anterior cingulate cortex following reactivation of a fear memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 142, n. 1, p. 66–78, 2017.

WEEBER, E. J.; ATKINS, C. M.; SELCHER, J. C.; et al. A role for the β isoform of protein kinase C in fear conditioning. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 16, p. 5906–5914, 2000.

XUE, Y.-X.; ZHU, Z.-Z.; HAN, H.-B.; et al. Overexpression of Protein Kinase M ζ in the Prelimbic Cortex Enhances the Formation of Long-Term fear Memory. **Neuropsychopharmacology**, v.1, n. 1, p. 1–31, 2015.

YAMAMOTO, K. K.; GONZALEZ, G. A.; MENZEL, P.; RIVIER, J.; MONTMINY, M. R. Characterization of a bipartite activator domain in transcription factor CREB. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 611–617, 1990.

YAO, Y.; KELLY, M. T.; SAJIKUMAR, S.; et al. PKM ζ maintains late long-term potentiation by N-ethylmaleimide- sensitive factor/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPA receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 31, p. 7820–7827, 2008.

YIN, Y.; EDELMAN, G. M.; VANDERKLISH, P. W. The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneurosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 4, p. 2368–2373, 2002.

ZAKHARENKO, S. S.; PATTERSON, S. L.; DRAGATIS, I.; et al. Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 975–990, 2003.

ZANCA, R. M.; SANAY, S.; AVILA, J. A.; et al. Contextual fear memory modulates PSD95 phosphorylation, AMPAR subunits, PKM ζ and PI3K differentially between adult and juvenile rats. **Neurobiology of Stress**, v. 10, n. 100139, p. 1-11, 2019.

ZUZINA, A. B.; VINARSKAYA, A. K.; BALABAN, P. M. Increase in serotonin precursor levels reinstates the context memory during reconsolidation. **Invertebrate neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 8, 2019.